

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA FARIAS WALTRICK

AVALIAÇÃO DE UM POSSÍVEL EFEITO SINÉRGICO ENTRE O ÓLEO DE PEIXE E
DIFERENTES CLASSES DE ANTIDEPRESSIVOS SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS DE DEPRESSÃO EM ANIMAIS DIABÉTICOS: UMA
ABORDAGEM PRÉ-CLÍNICA.

CURITIBA

2018

ANA PAULA FARIAS WALTRICK

AVALIAÇÃO DE UM POSSÍVEL EFEITO SINÉRGICO ENTRE O ÓLEO DE PEIXE E
DIFERENTES CLASSES DE ANTIDEPRESSIVOS SOBRE AS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS DE DEPRESSÃO EM ANIMAIS DIABÉTICOS: UMA
ABORDAGEM PRÉ-CLÍNICA.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Menezes Zanoveli

Coorientadora: Profa. Dra. Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Waltrick, Ana Paula Farias.

Avaliação de um possível efeito sinérgico entre o óleo de peixe e diferentes classes de antidepressivos sobre as respostas comportamentais de depressão em animais diabéticos: uma abordagem pré-clínica. / Ana Paula Farias Waltrick. – Curitiba, 2018.

62 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Janaina Menezes Zanoveli.

Coorientadora: Joice Maria da Cunha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Oleo de peixe. 2. Antidepressivos. 3. Diabetes. 4. Depressão. I. Título. II. Zanoveli, Janaina Menezes. III. Cunha, Joice Maria da Cunha. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.78



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA PAULA FARIAS WALTRICK** intitulada: **Avaliação de um possível efeito sinérgico entre o óleo de peixe e diferentes classes de antidepressivos sobre as respostas comportamentais de depressão em animais diabéticos: uma abordagem pré-clínica**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 15 de Outubro de 2018.


JANAÍNA MENEZES ZANOVELI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Avaliador Interno (UFPR)


LUIZ CLAUDIO FERNANDES

Avaliador Externo (UFPR)

A todas as mulheres incríveis que fazem parte da minha vida e me inspiram todos os dias a ser melhor. Vibro e torço por todas elas assim como sei que fazem por mim, **pois juntas somos mais fortes!**

AGRADECIMENTOS

Pensando em como escreveria estes agradecimentos, repassei várias memórias que esses dois anos (e mais um pouco...) de mestrado me proporcionaram. Foram vários dias de aprendizado, vontade de continuar e ser mais forte, e aqui me resta falar de tudo que aprendi e vivenciei nesses últimos anos. Além de experiências incríveis, vivi também amizades incríveis e relações que me fizeram crescer cada dia mais, e é para estas pessoas que meu agradecimento se estende.

Agradeço aos meus pais, Sandra e Luciano, pela paciência e por todo o apoio que sempre me deram. Admiro muito a forma como vocês sempre respeitaram meu espaço, me deram liberdade para ser quem sou, acreditar nos meus ideais e lutar por eles. Meus irmãos Carolina e José, por serem o porto mais forte de segurança quando tudo vira caos, por podermos nos apoiar uns nos outros confiando que aqui, nós seremos colo e conforto em todos os momentos.

Preciso agradecer também ao Adri, que esteve comigo nesta reta final e não mediu esforços para ser o melhor companheiro que eu poderia querer. Muito obrigada mesmo por tudo o que você tem feito por mim, todas as temporadas de Friends, as horas de Pokémon Go, por me apoiar nas minhas decisões e mergulhar de cabeça nessa aventura. Muito obrigada por compartilhar a vida comigo da melhor maneira possível!

Quero também agradecer à minha amiga Louise, por ser essa pessoa maravilhosa e tão sintonizada comigo em pensamentos e opiniões! Também agradeço muito à minha amiga Kauany por ser uma parceira incrível e está lá em todas as horas! Muito obrigada por serem as melhores amigas do mundo! Vocês são mulheres incríveis e eu sou muito grata por ter vocês ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada.

Agradeço também pela amizade de pessoas que tomaram outros rumos, mas que não perco contato e sei que faço parte da vida delas como fazem da minha. Principalmente dois amigos muito especiais que ganhei durante este mestrado e estão longe fisicamente, mas sempre próximos nos pensamentos: Eder, que me faz falta no café e nas conversas pelos corredores do departamento, e Vini, por quem tenho um amor de graça, como sempre te digo, e por quem tenho muita saudade!

Agradeço também aos colegas e amigos do departamento de Farmacologia. Quero destacar aqui meus irmãos de laboratório: Thiago, Yane e Manu, muito obrigada por tudo! Em especial, preciso agradecer à Helen, que me ensinou muito do que sei e foi um anjo no começo do mestrado! Muito obrigada!

Ao meu *lab partner* preferido, Alvaro, eu preciso deixar toda a minha gratidão. Pelos experimentos todos os dias, até tarde, fins de semanas, 24 horas sendo cientista e me ajudando incansavelmente. Muito obrigada por todos os cafés, *cheesecakes*, conversas filosóficas, por tudo o que me ensinou durante este tempo, e por se dispor a aprender comigo. Este trabalho só aconteceu de fato porque você sempre esteve ali comigo! Muito obrigada por tudo!

Agradeço também aos professores do departamento de Farmacologia, tão importantes na minha formação como pessoa, profissional e cientista. Entre todos que contribuíram imensamente comigo, preciso agradecer especialmente à profa. Joice, por ser uma das pessoas mais incríveis que eu conheço e admiro! Muito obrigada por tudo!

Por fim, meu agradecimento mais especial é para a minha mãe científica, profa. Jana, que me acolheu e me ensinou tanto, que quase não tenho palavras para descrever. Sou muito grata de poder compartilhar minhas vitórias com você sabendo que sua orientação é decisiva para que estas vitórias aconteçam. Muito obrigada por todas as experiências que vivemos juntas e espero que nossa parceria continue ainda por muitos anos!

Este mestrado com certeza foi a vivência mais surreal que vivi, com muito aprendizado, muitas novidades e, com certeza, muita vontade de continuar e ser uma cientista apta a enfrentar os desafios do futuro. A todos que estiveram e estão comigo, só tenho a agradecer, sempre!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.” - PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018.

“Your reward will be the widening of the horizon as you climb.

And if you achieve that reward, you will ask no other.”

Cecilia Payne-Gaposchkin

RESUMO

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica caracterizada pela hiperglicemia. Além de todas as complicações decorrentes da doença, também existem comorbidades importantes que prejudicam ainda mais a saúde do paciente. Entre eles, a depressão é a comorbidade psiquiátrica mais estudada associada ao diabetes *mellitus*. Os medicamentos de primeira linha usados para tratar a depressão associada ao diabetes são os antidepressivos, embora muitos pacientes sejam resistentes ou refratários a esses medicamentos. Além disso, esses tratamentos podem alterar a glicemia e até mesmo interferir nas drogas hipoglicemiantes. Sabe-se que o óleo de peixe (OP), rico em ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (AGPIs n-3), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), tem sido identificado como um importante composto com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, além de ser um composto antidepressivo, e pode ser um complemento interessante para os tratamentos convencionais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antidepressivo de uma suplementação prolongada com OP combinado com dois antidepressivos diferentes, o inibidor seletivo de recaptação de serotonina fluoxetina (FLX) e o composto tricíclico imipramina (IMI) que inibe a recaptação de serotonina e noradrenalina, em ratos com diabetes experimental induzida por estreptozotocina (STZ). Ratos *Wistar* machos com aproximadamente 120 g foram submetidos a uma suplementação durante 8 semanas com OP (3 g/kg, gavagem). No 28º dia de suplementação com OP (20% de EPA e 50% de DHA), os animais receberam uma única injeção de STZ (60 mg/kg; i.p.) para a indução do diabetes (DBT). O tratamento com veículo, FLX (5 ou 10 mg/kg, i.p.) ou IMI (5 ou 15 mg/kg; i.p.) começou no dia 42 e foi realizado por 14 dias nos animais controle e suplementados com OP. O teste do campo aberto e o teste de natação forçada modificado (TNFM) foram conduzidos no dia 56. Em seguida, o hipocampo dos animais foi coletado para análises neuroquímicas do conteúdo de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), e análise dos ácidos graxos no encéfalo. O plasma de alguns animais também foi coletado para avaliação dos ácidos graxos. O OP sozinho não alterou o comportamento do tipo-depressivo dos animais DBT. No entanto, quando combinado com FLX ou IMI, foi observada uma melhoria discreta no efeito do tipo antidepressivo induzido por FLX e IMI. Em relação às análises neuroquímicas, os níveis reduzidos de 5-HT e NA no hipocampo dos animais DBT foram revertidos após o tratamento com FLX ou IMI e não foram alterados após a suplementação com OP sozinho. As análises dos ácidos graxos mostraram que, apesar do aumento destes AGPIs n-3 no plasma, não houve incorporação dos AGPIs n-3 no hipocampo. Em conclusão, apesar da concentração de 5-HT ou NA do hipocampo não ter sido alterado após a suplementação prolongada com OP, esta suplementação foi capaz de induzir uma melhora discreta do efeito do tipo antidepressivo após o tratamento com IMI ou FLX.

Palavras-chave: ácidos graxos ômega-3, antidepressivos, diabetes, depressão, estreptozotocina, serotonina, noradrenalina.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* is a chronic disease characterized by hyperglycemia. In addition to all the complications arising from the disease, there are also important comorbidities that further harm patient's health. Among them, depression is the most studied psychiatric comorbidity associated with diabetes *mellitus*. The first-line drugs used to treat depression associated with diabetes are antidepressant drugs, although many patients are resistant or refractory to these drugs. In addition, these treatments can alter blood glucose and even interfere with hypoglycemic drugs. It is known that fish oil (FO), rich in polyunsaturated fatty acids of the omega-3 family (omega-3 PUFA) eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), has been identified as an important anti-inflammatory, antioxidant and antidepressant compound, and may be an interesting adjunct to the conventional therapies. Thus, the aim of this study was to evaluate the antidepressant effect of a preventive and prolonged treatment with FO combined with two different antidepressants, a selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine (FLX) and a tricyclic compound imipramine (IMI) that inhibits reuptake of serotonin and noradrenaline, in rats with experimental diabetes induced by streptozotocin (STZ). Male Wistar rats were submitted to a preventive treatment during 8 weeks with FO (3 g/kg, gavage). On the 28th day of FO treatment (20% - EPA and 50% - DHA), animals received a single injection of STZ (60 mg/kg; i.p.) for the induction of diabetes (DBT). Treatment with vehicle, FLX (5 or 10 mg/kg, i.p.) or IMI (5 or 15 mg/kg; i.p.) starts on the day 42 and last 14 days on control and FO-supplemented rats. The open field test and modified forced swimming test (mFST) were conducted on day 56. Then, the hippocampus of the animals was collected for neurochemical analyzes of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) content, and analysis of fatty acids in the brain. Plasma of some animals was also collected for evaluation of fatty acids. FO alone did not change the depressive-like behavior of the DBT animals. However, when combined with FLX or IMI a discrete improvement in the antidepressant-like effect induced by FLX and IMI was observed. In relation to the neurochemical analyzes, the reduced 5-HT and NA levels in the hippocampus of DBT animals was reverted after FLX or IMI treatment and it was not altered after FO treatment. Analysis of fatty acids showed no incorporation of n-3 PUFAs from the supplementation in the hippocampus, but there was an increase in n-3 PUFAs in the plasma. In conclusion, OP supplementation was able to induce a discrete enhancement of the IMI or FLX antidepressant-like effect even without altering the 5-HT or NA content in the hippocampus.

Keywords: omega-3 fatty acids, antidepressants, diabetes, depression, streptozotocin, serotonin, noradrenaline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da ação da STZ sobre as células β -pancreáticas.....	18
Figura 2: Via de biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados.....	23
Figura 3: EPA e DHA.....	24
Figura 4: Divisão dos grupos experimentais.....	30
Figura 5: Linha do tempo do delineamento experimental.....	35
Figura 6: Efeito da suplementação com óleo de peixe ou veículo, associado com fluoxetina sobre as frequências de imobilidade, natação e escalada em animais diabéticos submetidos ao TNFM.....	39
Figura 7: Efeito da suplementação com óleo de peixe ou veículo, associado com veículo ou imipramina, sobre as frequências de imobilidade, natação e escalada em animais diabéticos submetidos ao TNFM.....	42
Figura 8: Níveis de serotonina e noradrenalina no hipocampo de animais tratados com veículo, óleo de peixe, fluoxetina e/ou imipramina.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da suplementação com óleo de peixe ou seu veículo combinado com o antidepressivo fluoxetina nas doses 5 mg/kg e 10 mg/kg ou seu veículo sobre os parâmetros de glicemia, ganho de peso e número de cruzamentos no teste do campo aberto em animais diabéticos.....	44
Tabela 2: Efeito da suplementação com óleo de peixe ou seu veículo combinado com o antidepressivo imipramina nas doses 5 mg/kg e 15 mg/kg ou seu veículo sobre os parâmetros de glicemia, ganho de peso e número de cruzamentos no teste do campo aberto em animais diabéticos.....	45
Tabela 3: Concentração de ácidos graxos nas cápsulas de óleo de peixe (%)	48
Tabela 4: Concentração de ácidos graxos (%) nas amostras de hipocampo dos ratos dos grupos normoglicêmicos, diabéticos e diabéticos tratados com óleo de peixe.....	50
Tabela 5: Concentração de ácidos graxos (%) nas amostras de plasma dos ratos dos grupos normoglicêmico, diabéticos e diabéticos tratados com óleo de peixe.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

5-HT – Serotonina

AGPIs – Ácidos graxos poli-insaturados

AGPIs n-3 – Ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3

AGPIs n-6 – Ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-6

ANOVA – Análise de variância

DBT – Diabéticos

DHA – Ácido docosahexaenóico

DM – Diabetes *mellitus*

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

DSM-V – Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição

EPA – Ácido eicosapentaenoico

EPM – Erro padrão da média

FLX – Fluoxetina

GP – Ganho de peso

GS – Glicose sanguínea

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

IDF – *International Diabetes Federation*

i.p. - Intraperitoneal

IMI – Imipramina

ISRS – Inibidor seletivo de recaptação de serotonina

LPS – Lipopolissacarídeo

NA – Noradrenalina

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NGL – Normoglicêmicos

OMS – Organização Mundial de Saúde

OP – Óleo de peixe

STZ – Estreptozotocina

TCA – Teste do campo aberto

TNF- α – Fator α de necrose tumoral

TNFM – Teste da natação forçada modificado

VEI – Veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 DIABETES <i>MELLITUS</i>	16
1.2 DEPRESSÃO ASSOCIADA AO DIABETES	19
1.3 TRATAMENTO DA DEPRESSÃO ASSOCIADA AO DIABETES <i>MELLITUS</i>	21
1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3.....	22
2 OBJETIVOS E HIPÓTESE	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2.3 HIPÓTESE	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS.....	29
3.2 DROGAS.....	29
3.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	30
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	30
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	31
3.5.1 Teste de campo aberto.....	31
3.5.2 Teste de natação forçada modificada	31
3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEROTONINA OU NORADRENALINA NO HIPOCAMPO DOS ANIMAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE	32
3.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DO HIPOCAMPO E DO PLASMA DOS ANIMAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE	33
3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	34
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 EFEITO COMBINADO DO ÓLEO DE PEIXE COM FLUOXETINA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	37
4.2 EFEITO COMBINADO DO ÓLEO DE PEIXE COM A IMIPRAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM ANIMAIS DIABÉTICOS	40
4.3 EFEITO COMBINADO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E TRATAMENTO COM FLUOXETINA OU IMIPRAMINA SOBRE A GLICEMIA, O	

GANHO DE PESO E O NÚMERO DE CRUZAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO DE ANIMAIS DIABÉTICOS	43
4.4 EFEITO COMBINADO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E TRATAMENTO COM FLUOXETINA OU IMIPRAMINA SOBRE OS NÍVEIS DE SEROTONINA E NORADRENALINA NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	45
4.5 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE UTILIZADAS PARA SUPLEMENTAÇÃO	48
4.6 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS NGL E DBT (CONTROLE OU TRATADOS COM OP).....	49
4.7 CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS (%) NO PLASMA DOS ANIMAIS NGL E DBT (CONTROLE OU TRATADOS COM OP).....	50
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica que possui origens complexas e múltiplas, e é caracterizada principalmente pela hiperglicemia (*American Diabetes Association*, 2010). O número de pessoas com DM em 2017, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation* - IDF), chegou a 425 milhões e, até 2045 esse número deverá crescer em 48%, chegando a 629 milhões de pessoas (IDF, 2017). A IDF também traz números alarmantes em relação à América Latina, onde o número de indivíduos diabéticos chegou a 26 milhões de pessoas, com uma projeção de crescimento de 62% até 2045.

São três os principais tipos de DM, que se diferenciam de acordo com os mecanismos em que a hiperglicemia ocorre: o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e o diabetes gestacional. Entre os três tipos principais, o que ocorre com mais frequência é o DM2, e sua prevalência chega a 90% dos casos (Maleckas et al., 2015). Fatores importantes do estilo de vida atual estão altamente ligados com o desenvolvimento de DM2, como o sedentarismo, má nutrição, falta de exercícios físicos e, principalmente, a obesidade (Skyler et al., 2017; Temelkova-Kurktschiev & Stefanov, 2012).

Estudos vêm mostrando que a obesidade e o DM2 compartilham características importantes, como a alta presença de citocinas pró-inflamatórias (fator α de necrose tumoral – TNF- α e interleucinas 6 – IL-6), resistência à insulina, metabolismo alterado, disfunções celulares e até mesmo pré-disposição e fatores genéticos comuns às duas condições (Eckel et al., 2011; Yamazaki et al., 2011). No DM2, a hiperglicemia ocorre pela falta de produção de insulina e pela incapacidade do organismo em responder a ela, ou seja, quando ocorre resistência à insulina (IDF, 2017).

Em relação ao DM gestacional, mulheres grávidas que apresentam um aumento leve nos níveis de glicose sanguínea são diagnosticadas com DM gestacional, que acomete essas mulheres no segundo e terceiro trimestres de gestação (IDF, 2017). Durante o período gestacional, a mulher com DM pode apresentar outros problemas, como hipertensão, pré-eclâmpsia, além do risco da

necessidade de um nascimento por cesárea, que também cresce. No que diz respeito às crianças com mães que apresentaram DM gestacional, há pré-disposição ao desenvolvimento de obesidade, alterações metabólicas, resistência à insulina e DM2 durante a vida (Ashwal & Hod, 2015).

Por fim, e de interesse para este trabalho, o terceiro tipo de DM é o DM1 que é o menos prevalente na população (10% dos casos de DM no geral são DM1), porém não menos importante e grave. O DM1 é uma doença autoimune em que há a destruição imuno-mediada das células β -pancreáticas produtoras de insulina. A hiperglicemia ocorre, pois, a população de células β -pancreáticas diminui radicalmente e a produção de insulina cai de forma drástica (Li et al., 2014; Michels et al., 2015). Neste caso, o uso regular de insulina durante a vida dos pacientes diabéticos se torna necessário, para evitar assim a hiperglicemia, alterações de metabolismo, comorbidades, entre outras complicações da doença (Iqbal et al., 2018).

Os números populacionais de DM1 no mundo também são alarmantes, pois, de acordo com a IDF, mais de 1 milhão de crianças e adolescentes até 20 anos de idade apresentaram DM1 em 2017. Em relação aos adultos, os números do DM1 são difíceis de distinguir do DM2, portanto, não se sabe um número exato (Boden, 2018). Outro dado alarmante é que o Brasil aparece em 3º lugar entre os países com maior número de crianças e adolescentes até 20 anos de idade com DM1 em 2017, com um número de quase 90 mil diabéticos (IDF, 2017). Entre os sinais e sintomas do DM1, além da hiperglicemia, pode-se observar a polifagia (aumento na ingestão de alimentos), poliúria (aumento na eliminação de urina), polidipsia (sede excessiva), perda de peso, entre outros (Iqbal et al., 2018). Estas condições diminuem muito a qualidade de vida dos pacientes e justificam estudos que possam auxiliar nos tratamentos adequados a fim de controlar a progressão e ou a piora da doença.

Um dos modelos animais mais utilizados no mundo para se estudar o DM1 é o modelo induzido por estreptozotocina (STZ), um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces achromogens* (Szkudelski, 2001). A STZ possui uma molécula semelhante à molécula de glicose, que se liga de forma seletiva a transportadores de glicose do tipo GLUT2, muito presentes em células β -pancreáticas (Wu & Yan, 2015; Eleazu et al., 2013). Dentro das células β -pancreáticas, a citotoxicidade da STZ aumenta níveis de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e levando à morte celular e eliminação das células por macrófagos. Além disso, a STZ

também é um agente alquilante de DNA, causando danos importantes no DNA que também levam à morte celular.

O número de células β -pancreáticas atingidas e destruídas por ação da STZ é grande e a população celular diminui de forma expressiva, levando também à insuficiência de insulina e, conseqüentemente, hiperglicemia nos animais (Wu & Yan, 2015). Este processo está representado na Figura 1. Assim como o esperado, os animais com DM1 experimental apresentam as mesmas alterações que ocorrem em pacientes com DM1, ou seja, alterações no ganho de peso, polifagia, poliúria e polidipsia.

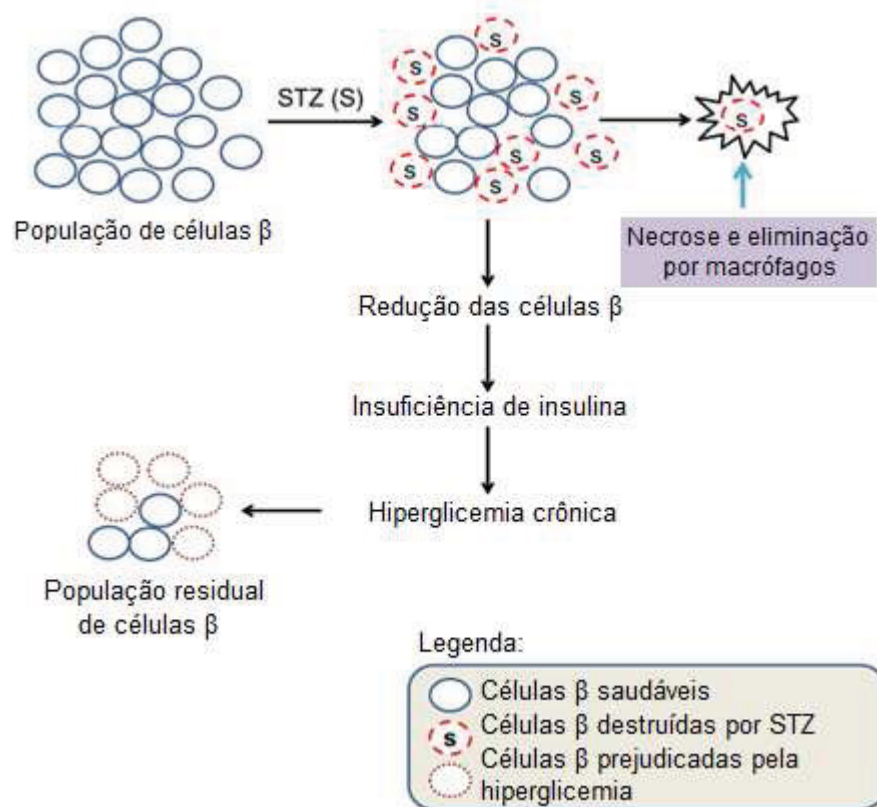


Figura 1: Esquema da ação da STZ sobre as células β -pancreáticas. Fonte: adaptado de Wu & Yan, 2015.

Os transportadores de glicose GLUT2 também estão presentes em rins e no fígado, que podem ser prejudicados por altas doses de STZ. Esta toxicidade é aguda e estes órgãos se recuperam com facilidade, pois a meia-vida da STZ é extremamente curta, sendo de aproximadamente 15 minutos. Outras lesões crônicas nestes órgãos são atribuídas à condição diabética e à hiperglicemia, não à STZ *per se* (Wu & Yan, 2015).

Trabalhos importantes sobre o modelo de STZ para indução de diabetes experimental também mostraram que a STZ não atravessa a barreira hematoencefálica, indicando que os danos causados no encéfalo e sobre as respostas emocionais são decorrentes da condição diabética e não da STZ *per se* (Karunanayake et al., 1974; Hirano et al., 2006).

Além das complicações da própria doença, o DM apresenta muitas comorbidades, sendo alguns exemplos importantes as doenças cardiovasculares, (Dei Cas et al., 2015, Avila et al., 2014), insuficiência renal (Thomas et al., 2015), neuropatia diabética (Schreiber et al., 2015), retinopatias (Hendrick et al., 2015) e periodontite (Zhou et al., 2015). Além dessas comorbidades físicas, existem também outras comorbidades que podem acometer pacientes diabéticos: as comorbidades psiquiátricas, que podem agravar ainda mais o quadro metabólico desses pacientes e suas outras comorbidades aumentando morbidade e mortalidade. Entre as comorbidades psiquiátricas associadas ao DM, é importante citar que pacientes diabéticos podem desenvolver diferentes tipos de transtornos de ansiedade (Siba et al., 2017; Majidi et al., 2015) e/ou transtornos depressivos, como a depressão maior (Zanoveli et al., 2016; Renn et al., 2011; Gilsanz et al., 2018), sendo a depressão associada ao DM de grande interesse para este estudo.

1.2 DEPRESSÃO ASSOCIADA AO DIABETES

A depressão é uma doença grave e altamente incapacitante. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 300 milhões de pessoas no mundo tenham depressão (OMS, 2015). Nas Américas, este número chegou a 50 milhões de pessoas em 2015, quase 5% da população. Além disso, a OMS alerta para os casos mais graves que levam ao suicídio, que é a segunda principal causa de morte entre adolescentes e jovens adultos de 15 a 29 anos de idade, levando à morte pelo menos 800 mil pessoas anualmente.

Existem alguns critérios que devem ser avaliados para um diagnóstico correto da depressão. De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-V, 2013), para o diagnóstico da depressão o paciente deve apresentar anedonia, que é a perda do prazer por atividades anteriormente prazerosas, e/ou um ou mais episódios de humor deprimido com pelo menos duas semanas de duração. Além disso, pelo menos mais cinco sintomas de

uma lista, tais como: sentimento de desesperança, sentimento de culpa, alterações de peso e apetite (perda ou ganho), alterações de sono (insônia ou hipersonia), agito ou retardo psicomotor, fadiga, entre outros. Um sintoma grave e importante para a depressão também são os pensamentos recorrentes sobre morte, com ou sem tentativas de suicídio (*American Psychiatric Association*, 2013). Um grande desafio para o paciente depressivo é o tratamento, sendo este desafio maior ainda para o paciente diabético com depressão.

Sabe-se que indivíduos diabéticos têm duas a três vezes mais chances de desenvolver depressão em comparação com a população em geral (Johnson et al., 2013; Roy & Lloyd, 2012; Boden, 2018), por exemplo, um estudo de 2012 mostrou que a depressão aparece mais em pacientes com DM1 em relação à população em geral (Roy & Lloyd, 2012). Levando em conta a prevalência entre homens e mulheres, sintomas depressivos aparecem em cerca de 12% a 29% dos homens diabéticos e em 23% a 30% das mulheres com DM (Lang & Borgwardt, 2013). Documentos importantes de órgãos ligados ao DM não trazem informações sobre a depressão associada ao DM, como por exemplo o Atlas da IDF (2017). Na verdade, poucos dados também são encontrados em documentos da OMS, por exemplo, quando se trata de depressão associada ao DM e, isto justifica pesquisas relacionadas a associação entre estas duas graves doenças, tanto para entendê-las melhor quanto para que haja mais divulgação sobre esta comorbidade importante do DM para a população no geral.

Vários estudos sugerem que existe uma relação bidirecional entre a depressão e o DM (Golden et al., 2008; Zanoveli et al., 2016), embora a fisiopatologia entre as duas doenças ainda seja pouco compreendida. Em um livro recém-publicado sobre o DM e suas comorbidades, Petrak e colaboradores comentam de mecanismos paralelos entre o DM e a depressão que podem auxiliar no entendimento da associação entre as duas doenças. É importante notar que tanto no DM quanto na depressão estudos clínicos e pré-clínicos mostram uma desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), desregulações no sistema imunológico (inflamações crônicas, neuroinflamação, aumento de citocinas pró-inflamatórias), alterações neuroquímicas (diminuição de monoaminas importantes no encéfalo que estão ligadas com a etiologia da depressão, como a serotonina – 5-HT – e a noradrenalina – NA), resistência à insulina, alterações cardiovasculares e estresse psicossocial (Petrak et al., 2018).

Além destas evidências, vários estudos mostram que animais com o DM experimental induzido por STZ apresentam comportamento do tipo-depressivo mais pronunciado quando comparados com animais não diabéticos, atingindo um pico deste comportamento na quarta semana após a injeção única de STZ (Redivo et al., 2016; de Moraes et al., 2018; ElBatsh, 2015; Caletti et al., 2012). Dessa maneira, esse modelo é um bom modelo para avançarmos nos estudos da fisiopatologia da depressão associada ao DM, bem como para estudarmos mecanismo de ação de novos compostos ou efeito de drogas.

1.3 TRATAMENTO DA DEPRESSÃO ASSOCIADA AO DIABETES *MELLITUS*

O tratamento utilizado em pacientes com depressão associada ao DM é feito principalmente com drogas antidepressivas monoaminérgicas, tais como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) como a fluoxetina (FLX) e a sertralina (Markowitz et al., 2011; Huang et al., 2013; Zanoveli et al., 2016). Muitos pacientes são resistentes e/ou refratários a esses medicamentos que também podem precipitar efeitos colaterais indesejáveis. Entre estes efeitos, podemos citar alterações na pressão sanguínea, alterações de peso, disfunção sexual (o que compromete a adesão aos medicamentos), além de um tempo de latência muito grande até que o tratamento comece a fazer efeito. Antidepressivos geralmente demoram cerca 21 dias para apresentar melhoras nos pacientes depressivos, o que, em casos mais graves, é altamente indesejável, levando em conta o risco de suicídio (Keller et al., 2002).

Além disso, em pacientes com depressão associada ao DM, alguns destes antidepressivos podem comprometer e alterar o controle glicêmico, além de interagir com drogas hipoglicemiantes (Ghaeli et al., 2004; Gomez et al., 2001; Erenmemisoglu et al., 1999; Barnard et al., 2013; Gagnon et al., 2018). Em um estudo recente, Gagnon e colaboradores (2018) apontaram os mais variados antidepressivos prescritos em casos de depressão associada ao DM e como estes antidepressivos comprometem o controle glicêmico. Vale destacar que os autores ressaltam que dentro da mesma classe de antidepressivos, como por exemplo, dos ISRS, o efeito sobre o controle glicêmico pode ser variável (Gagnon et al., 2018).

Estas evidências justificam a importância da busca por compostos que sejam eficazes em tratar a depressão associada ao DM ou, de maneira mais imediata, por

compostos adjuvantes ao tratamento desta comorbidade do DM. Tendo em vista que os antidepressivos são as drogas de primeira escolha para tratar a depressão associada ou não ao DM, a busca por compostos terapêuticos que possam auxiliar no tratamento principal, melhorando seu efeito ao reduzir sua dose ou aumentar seu efeito ou ainda reduzir efeitos adversos seria de extrema urgência atual. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem interesse em estudar compostos diferentes que possam auxiliar nesses tratamentos, como o canabidiol (de Moraes et al., 2018), o sulfato de magnésio e o óleo de peixe, rico em ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (Redivo et al., 2016), que foi objeto do presente estudo.

1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) da família ômega-3 (AGPIs n-3) têm sido extensivamente estudados como compostos para tratamento de diversas condições. Os ácidos graxos são moléculas formadas por cadeias que possuem um radical carboxil (-COOH) em uma extremidade, e um radical metil (-CHO) na outra (Curi, 2002). Eles podem ser saturados ou insaturados (possuem uma ou mais duplas ligações ao longo da cadeia), sendo estes últimos divididos em mono-insaturados ou poli-insaturados (Liu et al., 2015; Calder et al., 2015).

Os AGPIs estão divididos em três grupos, sendo dois principais, os AGPIs da família ômega-6 (AGPIs n-6) e os AGPIs n-3, foco de interesse deste estudo. Os AGPIs n-6 possuem a sua primeira dupla ligação entre os carbonos 6 e 7 a partir do radical metil da cadeia (carbono ômega), por isto a denominação ômega-6 ou n-6. Já os AGPIs n-3 possuem a primeira dupla-ligação entre os carbonos 3 e 4 também a partir do radical metil, por isto a denominação ômega-3 ou n-3 (Curi, 2002). Os AGPIs n-6 são derivados do ácido Linoléico (18 carbonos na cadeia e duas insaturações – 18:2), enquanto os AGPIs n-3 são derivados do ácido α -linolênico (18 carbonos e 3 insaturações – 18:3), e estas duas famílias competem entre si pelas enzimas (alongases e dessaturases) das cadeias de transformação (Dyall, 2015; Domenichiello et al., 2015). A conversão destes AGPIs ocorre em sua maior parte no retículo endoplasmático de hepatócitos, sendo que a última etapa de conversão ocorre nos peroxissomos também dos hepatócitos.

A Figura 2 ilustra a cadeia de conversão dos AGPIs n-6 e AGPIs n-3 e as enzimas utilizadas em todas as etapas, que incluem alongamentos (em que as

enzimas alongases adicionam dois carbonos à cadeia) e dessaturações (em que as enzimas dessaturases aumentam as insaturações na cadeia) (Calder, 2003). As duas famílias de AGPIs (n-6 e n-3) competem pelas mesmas enzimas na cadeia de transformação, sendo que na presença de AGPIs n-3, essa competição pelas enzimas faz com que a síntese de AGPIs n-6 diminua drasticamente, pois há uma preferência ao substrato n-3 em relação ao n-6 (Ganança et al., 2017).

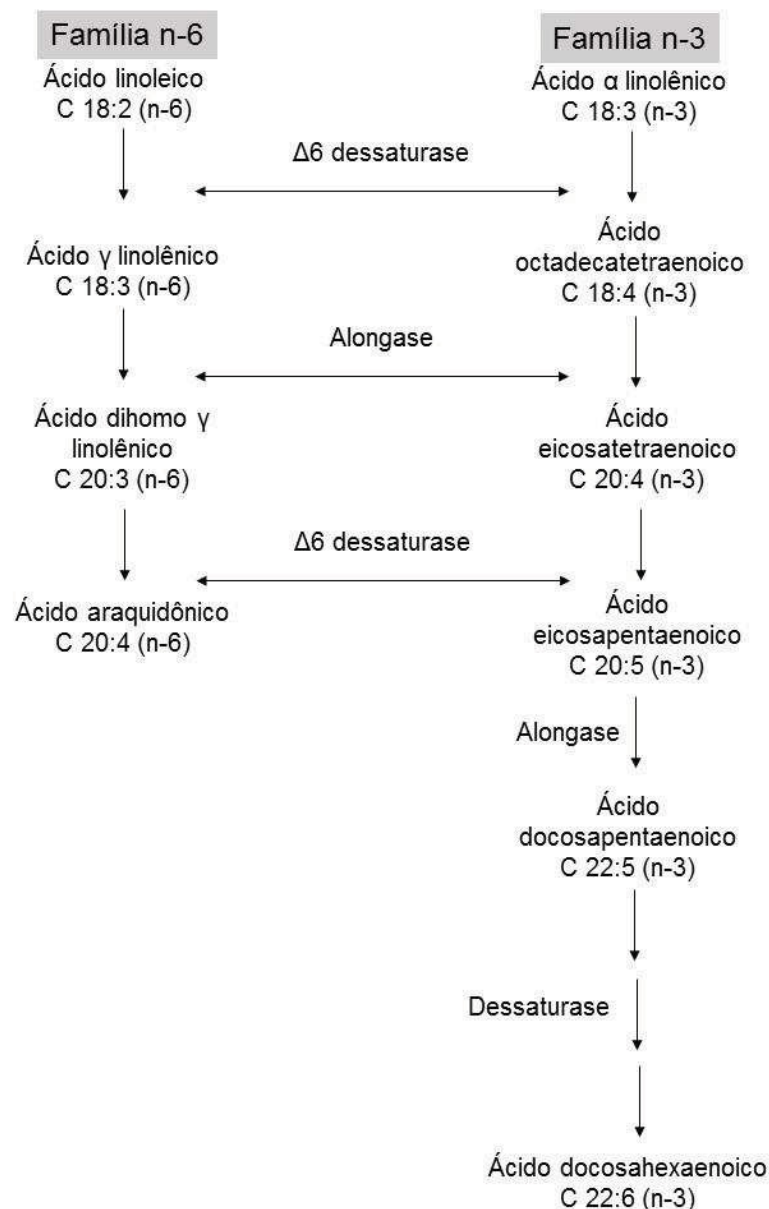


Figura 2: Via de biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados. Fonte: adaptado de Calder, 2003.

Os AGPIs n-3 e n-6 têm funções estruturais importantes, principalmente compondo fosfolipídios de membrana, principalmente o ácido Araquidônico (n-6) e o

ácido Docosahexaenóico (DHA) (Simopoulos, 2016). A presença de AGPIs na membrana plasmática mantém a fluidez da membrana, forma as balsas lipídicas, melhora sinalização celular, principalmente quando estes AGPIs são da família n-3 (Calder, 2012; Pike, 2003).

Outra função destes AGPIs n-3 e n-6 é a produção de mediadores lipídios, os chamados eicosanoides, que podem ter caráter pró ou anti-inflamatórios. Estes produtos são derivados dos AGPIs, e quando derivados dos AGPIs n-6, os eicosanoides incluem prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, mediadores importantes na regulação da inflamação. Quando em excesso, estão associados a processos inflamatórios em várias doenças, como a arterosclerose, obesidade e, inclusive, o DM (Calder, 2012; Simopoulos 2016). Os AGPIs n-3, principalmente o ácido Eicosapentaenóico (EPA) e o DHA, também possuem derivados eicosanoides importantes, entre eles os mediadores lipídicos chamados resolvinas. Estes mediadores possuem um caráter mais anti-inflamatório. (Serhan & Petasis, 2011).

Os AGPIs n-3 são o foco do nosso estudo e, sendo hidrocarbonetos essenciais aos mamíferos, não são sintetizados pelo organismo desses animais. Assim, só podem ser adquiridos pela alimentação ou pela suplementação nutricional com cápsulas de óleo de peixe (OP). Os AGPIs n-3 são encontrados principalmente em oleaginosas e peixes águas frias e profundas, como o atum, a sardinha e o salmão (Marsen et al., 1992; Arterburn et al., 2006; Messamore et al., 2017), e entre os AGPIs n-3, os mais estudados são principalmente o EPA (20:5 n-3) e o DHA (22:6 n-3), representados na Figura 3.

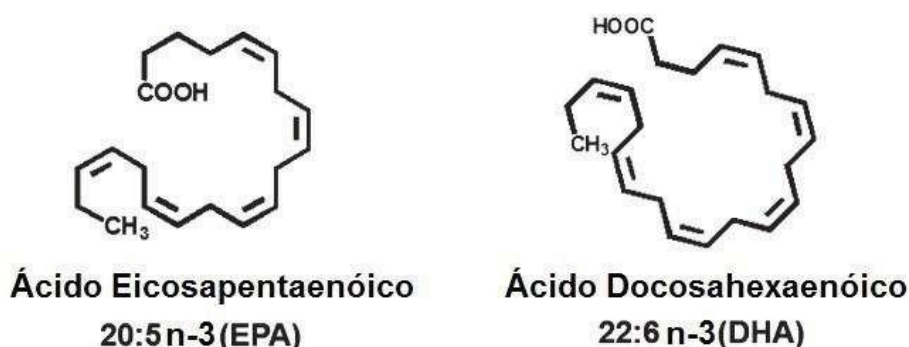


Figura 3: EPA e DHA. Fonte: adaptado de Jump et al., 2012.

Estes AGPIs n-3 possuem diversas funções celulares, pois fazem parte da estrutura das membranas plasmáticas compondo boa parte dos fosfolipídios de

membrana (Dyall, 2015), aumentando fluidez da membrana, além de auxiliar na formação de balsas lipídicas, ou *lipid rafts*. As balsas lipídicas são porções importantes da membrana plasmática compostas de glicoesfingolipídios e proteínas de membrana que atuam em sinalização celular (Quinn, 2014). Os AGPIs n-3 atuam também em receptores acoplados à proteína G, por exemplo o GPR120, importante na atividade anti-inflamatória, e em receptores ativados por proliferador de peroxissomo, os PPAR α e γ , receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição regulando genes (Calder, 2015). Estes AGPIs n-3, principalmente o EPA, também são substratos importantes para eicosanoides, mediadores lipídicos importantes para respostas inflamatórias, que no caso dos eicosanoides derivados de AGPIs n-3 possuem caráter anti-inflamatório interessante a ser explorado (Calder, 2017).

Em relação aos efeitos estudados em trabalhos pré-clínicos, vários autores mostraram efeitos importantes da suplementação com OP por exemplo no comportamento tipo-depressivo de ratos em vários modelos de depressão diferentes. Em 2008, Ferraz e colaboradores suplementaram com OP os animais em fases diferentes do desenvolvimento do encéfalo, tendo em vista que durante a formação e desenvolvimento do encéfalo a presença abundante de AGPIs é de extrema importância para a formação de neurônios com membranas saudáveis (Ferraz et al., 2008). Os autores observaram em fase posterior um comportamento do tipo antidepressivo desses animais. Posteriormente, outro estudo do mesmo grupo inferiu que este efeito seria decorrente da ação em receptores serotoninérgicos pós-sinápticos 5-HT_{1A}, indicando que os AGPIs n-3 podem ter melhorado a ação do sistema serotoninérgico, altamente relacionado com a etiologia da depressão (Carabelli et al., 2015).

Muitos outros trabalhos também mostraram o efeito antidepressivo de AGPIs n-3 em diferentes modelos de estudos da depressão, como a bullectomia olfatória, modelo de depressão associada à doença de Alzheimer, comportamento tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (um modelo de depressão com caráter inflamatório), além de efeitos neuroprotetores e antioxidantes muito importantes, entre muitos outros efeitos benéficos (Vines et al., 2012; Delattre et al., 2017; Naliwaiko et al., 2004; Wu et al., 2016).

Em relação aos efeitos do OP e dos AGPIs n-3 em animais com DM1 experimental, não existem muitos trabalhos na literatura (Jia et al., 2014; Redivo et

al., 2016; Siba et al., 2017). Em um desses estudos (Jia et al., 2014), uma melhora cognitiva foi observada e associada a um efeito anti-inflamatório pelo bloqueio do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um importante mediador inflamatório. Em outros trabalhos realizados com mesmo modelo e tratamento, dados do nosso grupo mostraram que uma suplementação prolongada de oito semanas com OP foi capaz de induzir um efeito do tipo ansiolítico (Siba et al., 2017) e do tipo antidepressivo (Redivo et al., 2016) em animais com DM1 experimental.

Em termos translacionais, se somado ao conhecimento científico e ao crescente uso de cápsulas de OP por parte da população, o OP parece um composto muito interessante para ser estudado e pode ter um potencial para ser utilizado como terapia única em algumas condições patológicas ou como adjuvante em tratamento de doenças mais complexas como doenças degenerativas ou doenças crônicas, como o DM.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito combinado da suplementação com OP, rico em AGPIs n-3, e duas classes de antidepressivos – ISRS ou não seletivo (composto tricíclico) - em diferentes doses, sobre o comportamento do tipo-depressivo em animais com DM1 experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação prolongada durante 8 semanas com óleo de peixe rico em AGPIs n-3 sobre o comportamento do tipo-depressivo de animais com DM1 experimental submetidos ao teste de natação forçada modificado (TNFM);
- Avaliar o efeito do tratamento com o antidepressivo não seletivo (composto tricíclico) imipramina (IMI) em doses diferentes (ineficaz e eficaz) combinado ou não com OP sobre o comportamento do tipo-depressivo em animais com DM1 experimental submetidos ao TNFM;
- Avaliar o efeito do tratamento com o antidepressivo ISRS fluoxetina (FLX) em doses diferentes (ineficaz e eficaz) combinado ou não com OP sobre o comportamento do tipo-depressivo em animais com DM1 experimental submetidos ao TNFM;
- Avaliar a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (TCA), assim como parâmetros associados ao DM1 (ganho de peso, glicemia sanguínea);
- Avaliar alterações neuroquímicas de 5-HT e NA no hipocampo de animais normoglicêmicos (NGL) e animais com DM1 experimental submetidos aos diferentes tratamentos;

- Avaliar a concentração de ácidos graxos presentes nas cápsulas de OP, em amostras de plasma e de hipocampo dos animais NGL e animais com DM1 experimental tratados ou não com OP.

2.3 HIPÓTESE

A suplementação prolongada com OP induzirá efeito do tipo antidepressivo *per se* além de uma melhora sobre a performance da ação antidepressiva dos antidepressivos monoaminérgicos, facilitando seus efeitos, inclusive de doses ineficazes. A suplementação prolongada com OP induzirá alterações neuroquímicas benéficas no encéfalo dos animais diabéticos e induzirá incorporação dos AGPIs provenientes da suplementação nos tecidos encefálicos analisados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para os experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* com peso entre 100g e 120g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e mantidos no departamento de Farmacologia também na UFPR. Os animais foram colocados em gaiolas plásticas (41 x 32 x 16,5 cm) e mantidos sob condições controladas em que ração e água estavam disponíveis livremente, a sala estava em condições de temperatura controladas (22 ± 2 °C) e o ciclo claro/escuro era de 12 horas, com luzes acesas às 7h e apagadas às 19h. Os testes comportamentais foram conduzidos durante a fase clara do ciclo em uma sala com 40 lux de luminosidade, e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e o número de animais. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (CEUA/BIO-UFPR; autorização #1020).

3.2 DROGAS

Para a realização dos experimentos deste estudo, foram utilizadas as seguintes drogas: estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotecnologia Inc., Santa Cruz, Califórnia, EUA), citrato de sódio (Merck SA Indústrias Farmacêuticas, Brasil), fluoxetina (FLX; EMS Sigma Pharma, Brasil), imipramina (IMI; Novartis Pharmaceutical Industry, Brasil), óleo de peixe (OP; gentilmente doado pelo Laboratório Herbarium Botânico S/A, Colombo, Paraná, Brasil) composto por 50% de DHA e 20% de EPA (total de 600 mg da cápsula de OP).

O OP foi administrado via oral por gavagem, e a dose utilizada foi de 3 g/kg por dia durante oito semanas. A STZ (60 mg/kg) foi dissolvida em tampão citrato (10 mM; pH 4,5) e administrada via intraperitoneal (i.p.) para indução do DM1. A FLX (5 ou 10 mg/kg) foi diluída em solução salina estéril e a IMI (5 ou 15 mg/kg) foi dissolvida em 5% de Tween 80 e solução salina estéril, e ambas as drogas foram administradas via i.p. Todas as doses e protocolos de tratamento foram baseados em estudos anteriores do nosso grupo (Redivo et al., 2016; Siba et al., 2017; de Moraes et al., 2014; da Silva Dias et al., 2016).

3.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

O DM1 experimental foi induzido nos animais após jejum noturno de 12 horas de duração. Na manhã após o jejum, os animais receberam uma única injeção via i.p. de STZ (60 mg/kg) dissolvida em tampão citrato. Os animais do grupo controle NGL receberam uma injeção via i.p. somente do tampão citrato. A condição diabética foi confirmada 72 horas após a injeção de STZ utilizando amostras de sangue da veia da cauda (5 µL) adicionadas a fitas-teste impregnadas com glucose oxidase (Accu-Check Active TM, Roche). Os ratos com glicemia sanguínea igual ou superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos e mantidos no estudo (de Moraes et al., 2016).

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 14 grupos experimentais, que estão representados na Figura 4. Os grupos foram: NGL/VEI/VEI, DBT/VEI/VEI, DBT/VEI/FLX 5, DBT/VEI/FLX 10, DBT/OP/VEI, DBT/OP/FLX 5, DBT/OP/FLX 10, DBT/VEI/IMI 5, DBT/VEI/IMI 10, DBT/OP/IMI 5 e DBT/OP/IMI 10, sendo que os grupos NGL/VEI/VEI, DBT/VEI/VEI e DBT/OP/VEI foram os grupos controle e, portanto, realizados duas vezes cada um (uma vez para o experimento da combinação de OP com FLX, e outra para o experimento da combinação de OP com IMI).

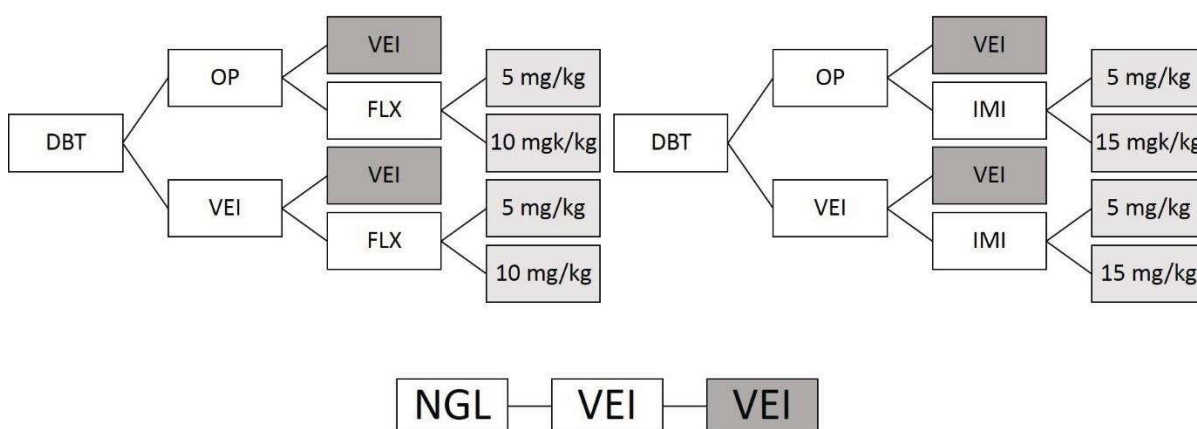


Figura 4: Divisão dos grupos experimentais. NGL = normoglicêmico, DBT = diabético, VEI = veículo, OP = óleo de peixe, FLX = fluoxetina (5 e 10 mg/kg), IMI = imipramina (5 e 10 mg/kg).

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Neste estudo, os testes comportamentais utilizados para avaliar a atividade locomotora e o comportamento tipo-depressivo dos animais foram os seguintes:

3.5.1 Teste de campo aberto

O aparato do TCA consiste em uma caixa retangular (40 cm x 50 cm x 63 cm) dividida em 9 unidades quadradas (de Moraes et al., 2018). Os animais foram posicionados no centro do aparato do campo aberto e a atividade exploratória foi registrada por 5 minutos via câmera Sony® 4 K. Para análise do teste, foi contabilizado o número de cruzamentos com as quatro patas nos quadrantes durante os 5 minutos do teste, e este número de cruzamentos foi utilizado como parâmetro de atividade locomotora geral.

3.5.2 Teste de natação forçada modificada

O teste de nado forçado foi inicialmente proposto por Porsolt e colaboradores (1978) e posteriormente modificado por Detke e colaboradores (1995). Para o teste, os animais foram colocados individualmente em cilindros de plástico (20 cm de diâmetro x 50 cm) contendo 30 cm de água a uma temperatura de 24 ± 1 °C durante 15 minutos para o pré-teste. O pré-teste do TNFM é capaz de gerar no animal o comportamento do tipo-depressivo por conta da situação de estresse durante os 15 minutos da sessão. Passadas 24 horas, os animais foram submetidos a uma sessão de teste de natação forçada por 5 minutos. O comportamento dos animais foi registrado via câmera Sony® 4 K para posterior análise.

Para a análise, o comportamento predominante expresso pelo animal a cada 5 segundos do vídeo foi quantificado - comportamento passivo (imobilidade) e ativo (natação e escalada). O comportamento de imobilidade é caracterizado pela ausência de movimentos do animal, exceto por alguns movimentos para flutuar e manter a cabeça fora da água. O comportamento de natação é caracterizado por movimentos ativos do animal no cilindro com água, apresentando movimentos claros de natação através do cilindro. Por fim, o comportamento de escalada é caracterizado por movimentos também ativos do animal, em que este move as patas

dianteadas em direçãõ às paredes do cilindro, indicando uma tentativa de escapar do aparato. Após as sessões de pré-teste e teste, os animais foram retirados da água, secados com toalhas e retornados às suas gaiolas. A água dos cilindros foi trocada a cada sessão para evitar a interferência entre os animais.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEROTONINA OU NORADRENALINA NO HIPOCAMPO DOS ANIMAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

Após a realização dos testes comportamentais, os animais passaram por eutanásia em que foram decapitados e tiveram seus encéfalos removidos. O hipocampo dos animais foi então dissecado e armazenado em freezer a -80 °C para posterior análise neuroquímica. Para análise de neurotransmissores, o sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi equipado com uma coluna de fase reversa ODS Nucleosil 150 3,2 mm C-18, com partícula de tamanho 5 µm (Supelco Inc., MO, EUA), acoplado com detecção eletroquímica.

A HPLC consistiu de um detector eletroquímico BAS Epsilon com um eletrodo de carbono de vidro e uma bomba (PM-92e). O potencial foi estabelecido em 650 mV (comparado com o eletrodo de referência Ag-AgCl). A fase móvel consistiu em NaH₂PO₄ 50 mM, Na₂-EDTA 0,1 mM, sulfato de sódio n-octil 0,5 mM, metanol a 4% (pH 5,5) e foi filtrada e bombeada através do sistema a um fluxo de velocidade 140 µl/min. O volume de injeção foi de 20 µl. Este arranjo permitiu a análise dos níveis de 5-HT e NA em cada amostra diluída em corridas que duraram aproximadamente 25 min. Para quantificação dos níveis de neurotransmissores, as áreas de pico foram comparadas às curvas padrão já descritas em trabalhos anteriores (Carvalho et al., 2012).

3.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DE ÁCIDOS GRAXOS DO HIPOCAMPO E DO PLASMA DOS ANIMAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

O perfil lipídico de ácidos graxos do hipocampo (0,015 g de amostra do tecido) e do plasma (100 µl de amostra) dos animais também foi analisado pela técnica de HPLC. Para realização de tal procedimento, as amostras passaram por algumas etapas: a extração lipídica, saponificação e derivatização.

A extração lipídica das amostras foi realizada a partir do método descrito por Folch e colaboradores (1957) em que, primeiramente, as amostras de tecido cerebral e plasma foram homogeneizadas em 1,33 ml de clorofórmio: etanol (2:1 v/v) em tubos de ensaio. Foi adicionado 0,24 ml de metanol ao sobrenadante da homogeneização para que as proteínas presentes fossem precipitadas e em seguida as amostras foram centrifugadas. A centrifugação durou 10 minutos a 2500 rpm em centrífuga própria para tubos. Após este processo, a fase superior (hidrometanólica) foi transferida para outro tubo e o que ficou precipitado, foi descartado. Ao novo tubo, foram adicionados 0,48 ml de clorofórmio e 0,41 ml de água para a formação de uma emulsão.

Em seguida, observou-se a formação de um sistema bifásico nos tubos e, em cada amostra, foi adicionado por 3 vezes, 1 ml da solução de Folch previamente preparada pelas paredes do tubo (clorofórmio: metanol: água, 3:48:47 v/v) para a lavagem do conteúdo. A cada adição, observou-se a formação de duas fases no tubo e o sobrenadante foi retirado com pipeta e descartado. Após a última adição de solução de Folch e descarte do sobrenadante, os lipídios extraídos presentes no tubo foram submetidos a uma secagem com fluxo de nitrogênio gasoso em banho-maria, a uma temperatura de aproximadamente 37°C.

Após a secagem com nitrogênio, as amostras passaram pelo processo de saponificação, para que fossem separados os ácidos graxos presentes nas amostras dos lipídios totais. Para tanto, foram adicionados 100 µl de metanol e 2 ml de solução alcalina em metanol (1 mol/L de NaOH em metanol 90%) a cada amostra, que em seguida foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação por 2 horas, em temperatura de 37°C (Nishiyama-Naruke et al., 1998). As amostras foram resfriadas e acidificadas com a adição de 1,5 ml de HCl até que o pH atingisse 3,0. A seguir, foi

adicionado hexano nos tubos, também por três vezes, para a extração dos ácidos graxos. Nesta etapa, o sobrenadante foi coletado a cada adição de hexano, enquanto o infranadante foi descartado no fim do processo. A fração de sobrenadantes extraídos foi transferida para outro tubo e novamente passou por secagem em nitrogênio gasoso e banho-maria.

O procedimento final antes da técnica de HPLC foi a derivatização das amostras. Para isto, os ácidos graxos que passaram pela secagem em nitrogênio gasoso foram ressuspensos com acetonitrila e derivatizados com Bromometil-Metóxi-Coumarin (BMMC) (1 mg/ml) por 15 minutos em uma temperatura de 60°C (Abushufa et al., 1994). Após a incubação, as amostras foram diluídas em acetonitrila em igual volume e transferidas para *vials* de injeção, e mantidas em temperatura de 10°C até o momento da técnica de HPLC.

Para a análise dos ácidos graxos no detector de fluorescência, as injeções realizadas foram de 100 µl por amostra. As injeções dos ácidos graxos foram feitas em cromatógrafo líquido Varian Pró-Star e separados em coluna de sílica C-8, com tamanho de poro de 5 µm de tamanho e saída de 100 Å. Os ácidos graxos foram detectados com detector de fluorescência e representados por meio de cromatogramas e relatórios com as detecções. A incorporação lipídica foi estimada através da porcentagem relativa de cada ácido graxo detectado, e as quantidades foram comparadas antes os grupos NGL, DBT e DBT/OP para mensurar as diferenças entre os grupos.

3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

A linha do tempo dos protocolos experimentais está presente na Figura 5. A suplementação prolongada com OP (3 mg/g, via oral, por gavagem) durou oito semanas (56 dias). O grupo controle recebeu um volume equivalente de água (via oral, por gavagem). No dia 28, o grupo diabético recebeu uma única dose i.p. de STZ (60 mg/kg) para a indução do DM1 experimental. A glicose sanguínea (GS) foi medida para confirmação do DM1 no dia 31 (72h após a injeção de STZ) e novamente no final dos testes comportamentais (no dia 56). Os tratamentos com veículo salina (VEI) ou antidepressivos (ATDs), o ISRS FLX (5 ou 10 mg/kg) ou o composto tricíclico IMI (5, 15 mg/kg) iniciaram no dia 42, permanecendo pelos

últimos 14 dias e também sendo via i.p. No dia 55, os animais foram submetidos ao pré-teste do TNFM e, no dia seguinte, submetidos ao TCA e à sessão-teste TNFM.

Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por meio de decapitação, os encéfalos foram removidos e os hipocampus coletados para posterior análise neuroquímica, além disso, foi coletado também o sangue de alguns animais para a análise dos ácidos graxos em tubos Falcon heparinizados, que foram centrifugados logo em seguida em 3000 rpm para a separação do plasma. O ganho de peso (GP) foi medido semanalmente e novamente após os testes comportamentais. As amostras de hipocampo e plasma foram guardadas em tubos de Eppendorf em temperatura -80 °C até a realização das análises posteriores.

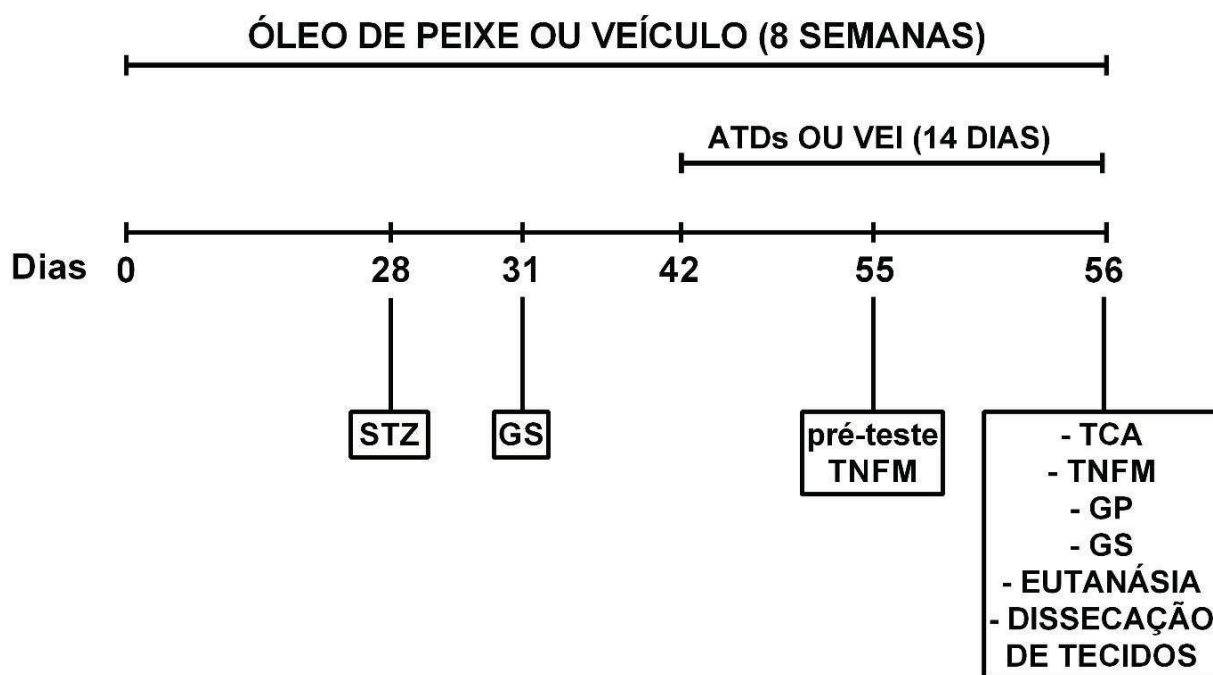


Figura 5: Linha do tempo do delineamento experimental. ATDS = antidepressivos, VEI = veículo, STZ = estreptozotocina, GS = glicose sanguínea, TNFM = teste da natação forçada modificado, TCA = teste do campo aberto, GP = ganho de peso.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes comportamentais (TCA e TNFM) foram relatados como média \pm erro padrão da média (EPM) e esses dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias sendo a suplementação com o OP e o tratamento com antidepressivos os dois fatores. Quando apropriado, o teste de Newman-Keuls foi usado como análise *post-hoc*.

Os dados das análises neuroquímicas foram relatados como mediana com intervalo interquartil. Para análise estatística, foram aplicados testes estatísticos não paramétricos. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar dois grupos – NGL/VEI/VEI e DBT/VEI/VEI. Em seguida, todos os grupos diabéticos (controles e tratados) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Por fim, as determinações de incorporação dos ácidos graxos foram relatadas com média \pm desvio padrão (DP) e a análise estatística foi feita com ANOVA de uma via, com posterior teste de Newman-Keuls quando necessário.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism (versão 6, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO COMBINADO DO ÓLEO DE PEIXE COM FLUOXETINA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

A ANOVA de duas vias da frequência de imobilidade (Figura 6, painel A) mostra um efeito estatístico significativo dos dois fatores – suplementação com OP [$F(1, 38) = 11,49$; $p < 0,05$] e tratamento com FLX [$F(2, 38) = 16,50$; $p < 0,05$], mas não mostrou interação entre esses dois fatores [$F(2, 38) = 0,3630$; $p > 0,05$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que houve uma diminuição na frequência de imobilidade entre animais diabéticos tratados com VEI que receberam FLX (10 mg/kg) quando comparados com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). Adicionalmente, os animais diabéticos tratados com OP que receberam FLX (5 ou 10 mg/kg) também mostraram uma diminuição na frequência de imobilidade quando comparados com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). Os animais diabéticos tratados com grupo OP que receberam FLX (10 mg/kg) também diferiram dos animais diabéticos tratados com OP que receberam VEI ($p < 0,05$). Outro resultado significativo foi a diminuição na frequência de imobilidade do grupo de animais diabéticos tratados com OP recebendo FLX (10 mg/kg) quando comparado ao grupo diabético tratado com VEI recebendo FLX (10 mg/kg) ($p < 0,05$).

Quando a frequência de natação foi avaliada (Figura 6, painel B), a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo em ambos os fatores – suplementação com OP [$F(1, 38) = 29,96$; $p < 0,05$] e tratamento com FLX [$F(2, 38) = 14,22$; $p < 0,05$], mas não houve interação entre os fatores [$F(2, 38) = 0,5562$; $p > 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou uma diferença significativa - um aumento na frequência de natação - entre animais diabéticos tratados com VEI que receberam FLX (10 mg/kg) quando comparados com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). Além disso, foi observado um aumento na frequência de natação em todos os animais diabéticos tratados com OP quando comparado com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$).

Os animais diabéticos tratados com OP que receberam FLX (10 mg/kg) também apresentaram uma maior frequência de natação quando comparados aos animais diabéticos tratados com OP que receberam VEI ($p < 0,05$). Outro resultado interessante é que houve um aumento na frequência de natação dos animais

diabéticos que receberam a combinação de OP e FLX nas duas doses (ineficaz e eficaz) quando comparados aos animais diabéticos tratados com VEI que receberam FLX nas respectivas doses ($p < 0,05$).

Quando a escalada foi avaliada (Figura 6, painel C), a ANOVA de duas vias não mostrou efeito estatístico significativo (fator suplementação com OP: $[F(1, 38) = 0,012; p > 0,05]$; fator tratamento com FLX: $[F(2, 38) = 1,83; p > 0,05]$).

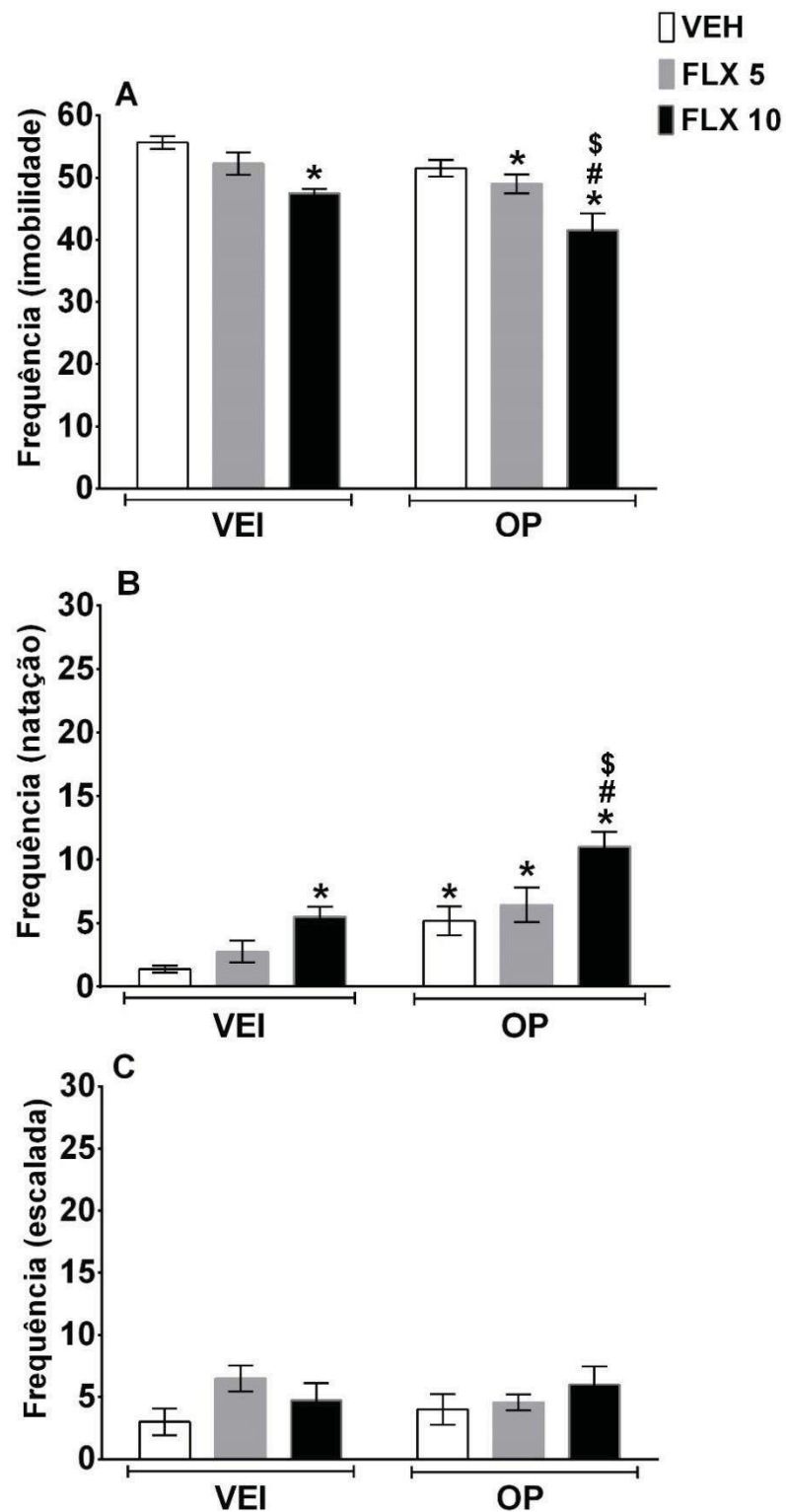


Figura 6: Efeito da suplementação com óleo de peixe (OP) ou veículo (VEI), associado com fluoxetina (5 mg/kg – FLX 5, 10 mg/kg – FLX 10) sobre as frequências de imobilidade (painel A), natação (painel B) e escalada (painel C) em animais diabéticos submetidos ao TNFM. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM ($n = 6 - 10/\text{grupo}$). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo VEI/VEI, # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo OP/VEI e \$ $p < 0.05$ quando comparado ao grupo VEI/FLX 10.

4.2 EFEITO COMBINADO DO ÓLEO DE PEIXE COM A IMIPRAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM ANIMAIS DIABÉTICOS

A ANOVA de duas vias (Figura 7, painel A) mostra um efeito estatístico significativo do fator tratamento com IMI [$F(2, 29) = 21,35$; $p < 0,05$], mas não mostrou efeito estatístico significativo do fator suplementação com OP [$F(1, 29) = 0,05497$; $p > 0,05$] nem interação entre esses fatores [$F(2, 29) = 3,110$; $p > 0,05$] quando a frequência de imobilidade foi avaliada. O teste de Newman-Keuls mostrou que houve uma diminuição na frequência de imobilidade entre animais diabéticos tratados com VEI que receberam IMI (15 mg/kg) quando comparados com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). Além disso, os animais diabéticos tratados com OP que receberam IMI (15 mg/kg) também mostraram uma diminuição na frequência de imobilidade quando comparados com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). Estes dois grupos (VEI/IMI 15 e OP/IMI 15) também exibiram uma frequência de imobilidade reduzida em comparação com o grupo de animais diabéticos tratados com OP que receberam VEI ($p < 0,05$).

Quanto à avaliação da frequência de natação (Figura 7, painel B), a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo em ambos os fatores - fator suplementação com OP [$F(1, 29) = 9,168$; $p < 0,05$] e fator tratamento com IMI [$F(2, 29) = 11,37$; $p < 0,05$], e também mostrou interação entre os dois fatores [$F(2, 29) = 6,267$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou uma diferença significativa - um aumento na frequência de natação - entre animais diabéticos tratados com OP que receberam IMI (15 mg/kg) quando comparados com animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). O aumento na frequência de natação de animais diabéticos tratados com OP recebendo IMI (15 mg/kg) também ocorre quando comparado ao grupo animais diabéticos tratados com OP recebendo VEI ($p < 0,05$) e quando comparado com animais diabéticos tratados com VEI recebendo IMI (15 mg/kg) ($p < 0,05$).

Em relação à frequência de escalada (Figura 7, Painel C), a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística significativa no fator tratamento com IMI [$F(2, 29) = 10,94$; $p < 0,05$], mas não houve diferença estatística para o fator suplementação com OP [$F(1, 29) = 0,9999$; $p > 0,05$] e nenhuma interação entre os dois fatores [$F(2, 29) = 0,4151$; $p > 0,05$]. O teste *post-hoc* mostrou um aumento na frequência de

escalada nos animais diabéticos tratados com VEI que receberam IMI (15 mg/kg) quando comparados com os animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI. Além disso, houve uma maior frequência de escalada nos animais diabéticos tratados com OP que receberam IMI (15 mg/kg) em comparação com os animais diabéticos tratados com OP que receberam VEI.

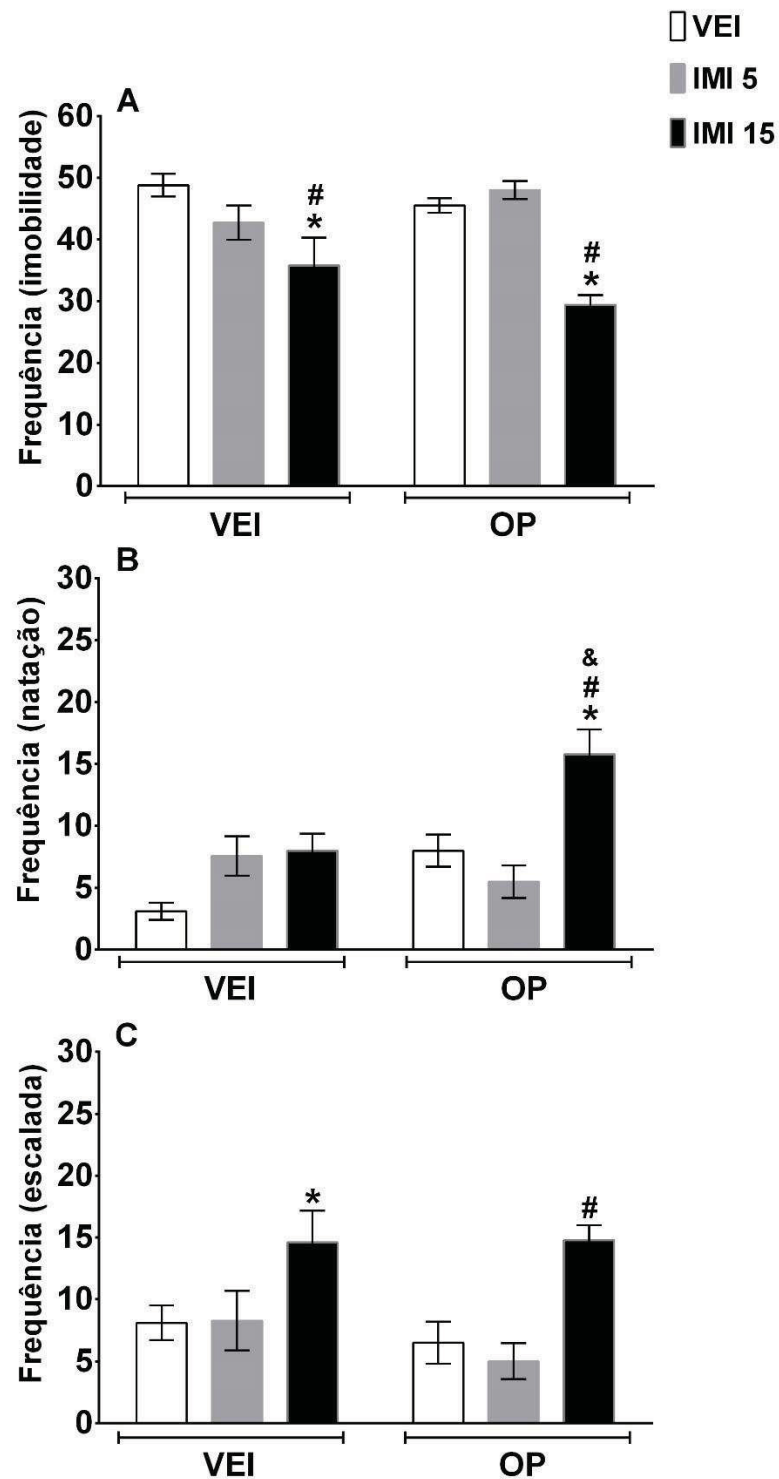


Figura 7: Efeito da suplementação com óleo de peixe (OP) ou veículo (VEI), associado com veículo (VEI) ou imipramina (5 mg/kg – IMI 5, 15 mg/kg – IMI 15), sobre as frequências de imobilidade (painel A), natação (painel B) e escalada (painel C) em animais diabéticos submetidos ao TNFM. Todos os valores foram expressos como a média \pm EPM (n = 6-10/grupo). * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo VEI/VEI, # $p < 0.05$ quando comparado com o grupo OP/VEI e & $p < 0.05$ quando comparado com VEI/IMI 15.

4.3 EFEITO COMBINADO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E TRATAMENTO COM FLUOXETINA OU IMIPRAMINA SOBRE A GLICEMIA, O GANHO DE PESO E O NÚMERO DE CRUZAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Os tratamentos realizados não foram capazes de modificar os parâmetros de glicemia, ganho de peso e número de cruzamentos no teste do campo aberto (Tabela 1). Para o parâmetro de glicemia, a ANOVA de duas vias não mostrou um efeito estatístico significativo no fator suplementação com OP [$F(1, 38) = 0,003299$; $p > 0,05$], nem para o fator tratamento com FLX [$F(2, 38) = 0,09493$; $p > 0,05$], e também não houve efeito significativo na interação entre os dois fatores [$F(2, 38) = 0,2322$; $p > 0,05$].

Em relação ao ganho de peso, a ANOVA de duas vias também não apresentou efeito estatístico para nenhum dos dois fatores (fator suplementação com OP: [$F(1, 38) = 0,3454$; $p > 0,05$], fator tratamento com FLX: [$F(2, 38) = 1,491$, $p > 0,05$]) e também não houve interação entre os fatores [$F(2, 38) = 1,049$; $p > 0,05$]. Finalmente, em relação ao número de cruzamentos no TCA, a ANOVA de duas vias também não mostrou efeito estatístico significativo para os dois fatores (fator suplementação com OP: [$F(1, 38) = 0,6999$; $p > 0,05$], fator tratamento com FLX [$F(2, 38) = 0,7834$, $p > 0,05$], e também não houve interação entre os dois fatores para este parâmetro [$F(2, 38) = 1,002$, $p > 0,05$] (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito da suplementação com óleo de peixe (OP) ou seu veículo (VEI) combinado com o antidepressivo fluoxetina (FLX) nas doses 5 mg/kg (FLX 5) e 10 mg/kg (FLX 10) ou seu veículo (VEI) sobre os parâmetros de glicemia, ganho de peso e número de cruzamentos no teste do campo aberto em animais diabéticos.

Suplementação/ tratamento com antidepressivo	Glicemia (mg/dL) (média)	Ganho de peso (g) (variação de peso)	Número de cruzamentos no TCA
VEI/VEI	473,30 ± 26,090	113,400 ± 12,870	31,880 ± 4,099
VEI/FLX 5	448,10 ± 23,350	112,500 ± 8,785	28,630 ± 3,808
VEI/FLX 10	452,50 ± 38,430	102,800 ± 12,740	24,500 ± 3,246
OP/VEH	450,00 ± 20,070	122,800 ± 6,804	27,670 ± 5,352
OP/FLX 5	451,90 ± 30,600	99,570 ± 11,740	20,570 ± 3,470
OP/FLX10	467,90 ± 27,280	100,100 ± 11,090	28,140 ± 5,298

Resultados foram expressos como a média ± EPM; n = 6-10.

A suplementação com OP isolado ou em combinação com o tratamento com a IMI não foram capazes de modificar os parâmetros de glicemia, ganho de peso e número de cruzamentos (Tabela 2). Para o parâmetro de glicemia, a ANOVA de duas vias não mostrou diferença estatística significativa para o fator tratamento com IMI [$F(2, 29) = 0,9489$; $p > 0,05$], mas houve diferença estatística para o fator suplementação com OP [$F(1, 29) = 4,581$; $p < 0,05$] e também houve interação entre os dois fatores [$F(2, 29) = 4,574$; $p < 0,05$]. No entanto, o teste de Newman-Keuls não mostrou diferença entre os grupos e tratamentos estudados ($p > 0,05$).

Em relação ao ganho de peso, a ANOVA de duas vias não apresentou diferença estatística significativa para nenhum dos fatores - fator suplementação com OP [$F(1, 29) = 0,5725$; $p > 0,05$] e fator tratamento com IMI [$F(2, 29) = 0,1229$; $p > 0,05$], assim como não houve interação entre os dois fatores [$F(2, 29) = 0,03489$; $p > 0,05$]. Finalmente, em relação ao número de cruzamentos no teste do campo aberto, a ANOVA de duas vias não mostrou efeitos estatísticos significativos em nenhum dos fatores - fator suplementação com OP [$F(1, 29) = 0,1194$; $p > 0,05$] e fator tratamento com IMI [$F(2, 29) = 1,733$; $p > 0,05$], e também não houve interação entre os dois fatores [$F(2, 29) = 0,3355$; $p > 0,05$] (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito da suplementação com óleo de peixe (OP) ou seu veículo (VEI) combinado com o antidepressivo imipramina (IMI) nas doses 5 mg/kg (IMI 5) e 15 mg/kg (IMI 15) ou seu veículo (VEI) sobre os parâmetros de glicemia, ganho de peso e número de cruzamentos no teste do campo aberto em animais diabéticos.

Suplementação/ tratamento com antidepressivo	Glicemia (mg/dL) (média)	Ganho de peso (g) (variação de peso)	Número de cruzamentos no TCA
VEI/VEI	555,300 ± 21,850	105,200 ± 21,680	32,000 ± 5,922
VEI/IMI 5	497,700 ± 22,810	97,430 ± 21,610	26,430 ± 1,837
VEI/IMI 15	473,800 ± 18,020	95,000 ± 28,740	26,000 ± 2,236
OP/VEH	519,000 ± 22,450	112,500 ± 9,725	36,670 ± 6,637
OP/IMI 5	569,300 ± 13,010	109,000 ± 12,290	30,000 ± 6,962
OP/IMI 15	547,600 ± 21,660	106,400 ± 17,750	22,400 ± 6,875

Resultados foram expressos como a média ± EPM; n = 6-10.

4.4 EFEITO COMBINADO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E TRATAMENTO COM FLUOXETINA OU IMIPRAMINA SOBRE OS NÍVEIS DE SEROTONINA E NORADRENALINA NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

O teste de Mann-Whitney mostrou uma diferença estatística significativa entre animais normoglicêmicos e animais diabéticos controle (DBT/VEI/VEI) (Figura 8, painéis A e B). Tanto a serotonina (painel A - Mann-Whitney U = 2.000; p = 0,0173) quanto a noradrenalina (painel B - Mann-Whitney U = 0,0; p = 0,0043) estão diminuídas nos animais diabéticos quando comparados ao grupo normoglicêmico (p<0,05).

O teste de Kruskal-Wallis mostra alguns resultados interessantes sobre os níveis de serotonina (painel A) entre os grupos experimentais de animais diabéticos. Animais que receberam apenas 10 mg/kg de FLX mostraram um aumento nos níveis de serotonina quando comparados ao grupo de animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI (p<0,05). Outro grupo com níveis serotoninérgicos semelhantes aumentados em relação aos animais diabéticos que foram tratados com VEI e recebeu VEI, foi o grupo que recebeu OP combinado com FLX na dose de 10 mg /kg (p<0,05). No mesmo gráfico podemos observar que os grupos que receberam imipramina nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg não foram significativamente diferentes do grupo controle (DBT/VEI/VEI), mas há uma tendência de aumento dos níveis serotoninérgicos também nesses grupos.

Os níveis de noradrenalina (painel B) foram aumentados nos animais diabéticos tratados com VEI que receberam IMI (5 mg/kg ou 15 mg/kg) em relação aos animais diabéticos tratados com VEI que receberam VEI ($p < 0,05$). Além disso, há também um aumento nos níveis noradrenérgicos dos animais diabéticos tratados com OP que receberam IMI (5 mg/kg ou 15 mg/kg) quando comparados com animais diabéticos tratados com OP que receberam VEI ($p < 0,05$).

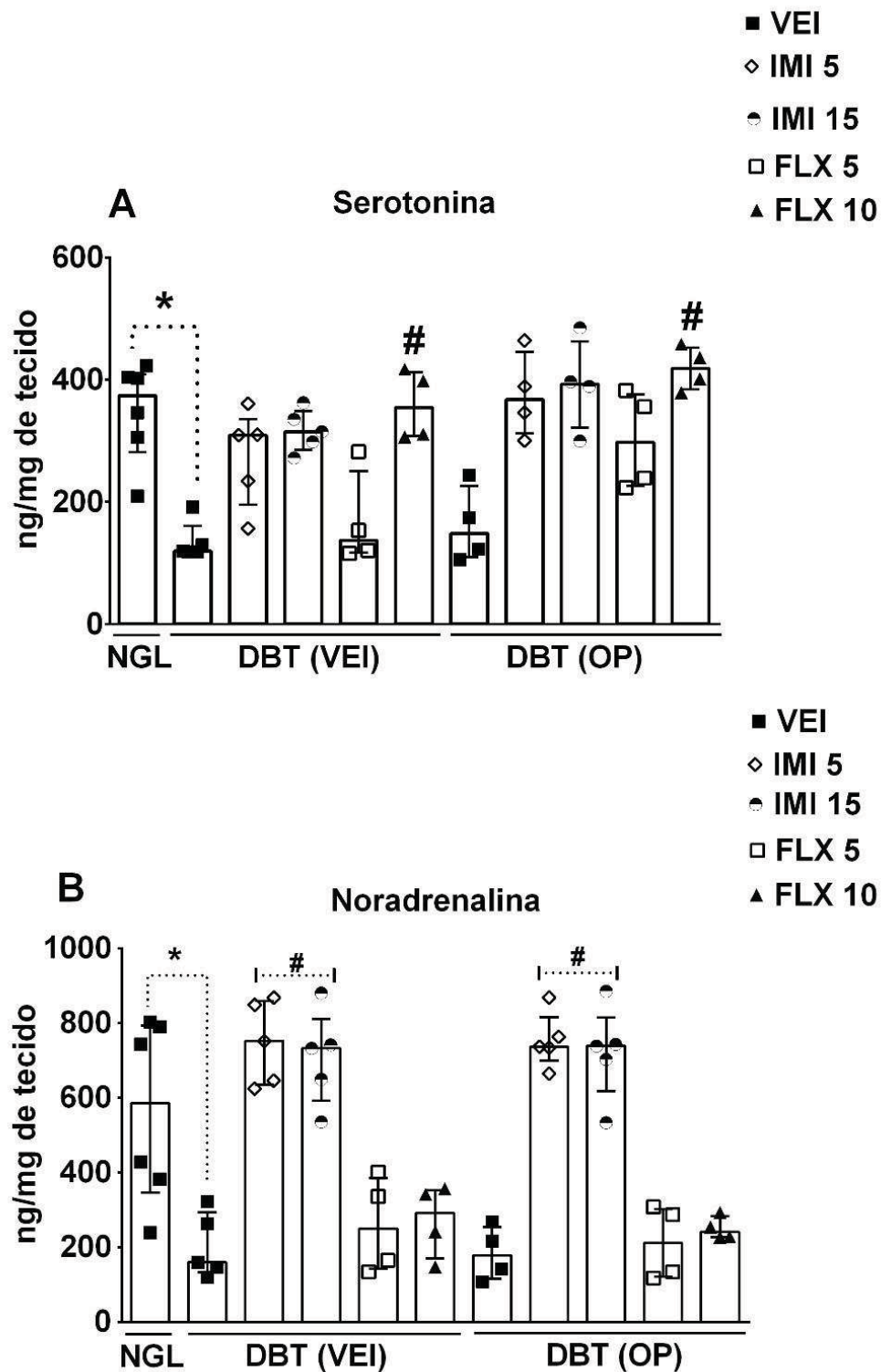


Figura 8: Níveis de serotonina (painel A) e noradrenalina (painel B) no hipocampo de animais tratados com veículo (VEI), óleo de peixe (OP), fluoxetina (5 mg/kg – FLX 5, 10 mg/kg – FLX 10), e/ou imipramina (5 mg/kg – IMI 5, 15 mg/kg – IMI 15). NGL = normoglicêmicos (NGL); DBT = diabéticos. Valores foram expressos como a mediana com intervalo interquartil (n = 4 – 6/grupo). *p<0,05 quando comparado com o grupo NGL e #p<0,05 quando comparado com seu respectivo grupo controle.

4.5 CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) DAS CÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE UTILIZADAS PARA SUPLEMENTAÇÃO

A Tabela 3 mostra os ácidos graxos presentes nas cápsulas de OP analisadas em cromatografia e suas concentrações representadas em porcentagem relativa ao total da amostra. Esta análise foi feita para avaliar a quantidade de EPA e DHA presentes nas cápsulas e confirmar os dados disponibilizados pelo fabricante, em que o DHA compõe 50% da cápsula e o EPA 20%. Nossos resultados confirmaram que as quantidades de EPA realmente são inferiores às de DHA presentes nas cápsulas. Assim, quando observamos as quantidades relativas de EPA e DHA em relação aos ácidos graxos presentes na cápsula e detectados pela cromatografia, o DHA aparece com quase 70% de concentração, e o EPA, aproximadamente 25%. Além disso, outros ácidos graxos foram detectados em menores quantidades, os poli-insaturados n-6 Linoléico (aproximadamente 1%) e Araquidônico (aproximadamente 5%). Quando calculamos os valores de EPA e DHA em relação ao conteúdo total da cápsula, os valores do fabricante se confirmam em 20% de EPA e 50% de DHA.

Tabela 3: Conteúdo de ácidos graxos nas cápsulas de óleo de peixe (%).

Ácido graxo	Cápsulas de óleo de peixe
Linoléico (18:2 n-6)	1,21±1,71
Araquidônico (20:4 n-6)	5,22±0,11
EPA (20:5 n-3)	24,51±0,48
DHA (22:6 n-3)	69,05±1,11

Resultados são expressos como média± desvio padrão;

n = 2;

4.6 CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS NGL E DBT (CONTROLE OU TRATADOS COM OP)

A Tabela 4 mostra os resultados da incorporação dos ácidos graxos no hipocampo de animais dos grupos NGL, DBT controle e DBT tratado com OP. A ANOVA de uma via não mostrou diferença estatisticamente significativa para a maioria dos ácidos graxos analisados nas amostras, como por exemplo, os ácidos graxos saturados Palmítico [F (2, 14) = 0,3673; $p > 0,05$] e Esteárico [F (2, 14) = 2,076; $p > 0,05$]. ANOVA de uma via também não mostrou diferença significativa entre o ácido graxo monoinsaturado Oléico [F (2, 14) = 2,947; $p > 0,05$] e o AGPI n-6 Araquidônico [F (2, 14) = 1,068; $p > 0,05$].

Entre os ácidos graxos analisados nas amostras de hipocampo, somente dois mostraram diferenças estatísticas na ANOVA de uma via entre os grupos experimentais. O primeiro foi o AGPI n-6 Linoléico [F (2, 14) = 4,480; $p < 0,05$], o qual a análise *post-hoc* de Newman Keuls mostrou um ligeiro aumento nos grupos DBT (tanto o grupo controle quanto o tratado com OP) em relação ao grupo NGL ($p < 0,05$). O segundo ácido graxo que apresentou diferenças estatísticas na ANOVA de uma via foi o DHA [F (2, 14) = 6,927; $p < 0,05$], e o teste de Newman-Keuls mais uma vez mostrou um aumento nos níveis deste ácido graxo nos grupos DBT (tanto controle quanto o grupo tratado com OP) em relação ao grupo NGL ($p < 0,05$).

É interessante notar que a suplementação com OP não foi capaz de modificar os níveis de DHA no hipocampo dos animais com diabetes experimental. Outro dado interessante é que os níveis de EPA no hipocampo são tão baixos que não foram detectados pela análise de HPLC em nenhum dos grupos.

Tabela 4: Conteúdo de ácidos graxos (%) nas amostras de hipocampo dos ratos dos grupos normoglicêmicos (NGL), diabéticos (DBT) e diabéticos tratados com óleo de peixe (DBT/OP). ND=não detectado.

Ácido graxo	NGL	DBT	DBT/OP
Láurico (12:0)	ND	ND	ND
Mirístico (14:0)	ND	ND	ND
Palmítico (16:0)	22,85±1,06	23,21±2,73	22,24±1,40
Esteárico (18:0)	14,91±0,63	10,38±6,01	13,90±1,40
Oléico (18:1)	25,01±1,57	22,33±2,15	22,99±1,32
Linoléico (18:2 n-6)	ND	1,17±1,07*	1,49±0,76*
α-linolénico (18:3 n-3)	ND	ND	ND
Araquidônico (20:4 n-6)	16,59±1,82	17,79±2,19	16,18±1,56
EPA (20:5 n-3)	ND	ND	ND
DHA (22:6 n-3)	20,89±1,30	24,40±0,89*	23,19±1,78*
Razão n6:n3	0,79	0,77	0,76
Índice de insaturação	216,71	242,23	229,83

Resultados são expressos como média ± desvio padrão; n = 4-6.

*p<0,05 quando comparado ao grupo NGL;

4.7 CONTEÚDO DOS ÁCIDOS GRAXOS (%) NO PLASMA DOS ANIMAIS NGL E DBT (CONTROLE OU TRATADOS COM OP)

Os resultados das análises de incorporação de ácidos graxos no plasma dos animais mostraram alguns dados interessantes para discussão no nosso trabalho. A Tabela 5 mostra as concentrações dos ácidos graxos analisados (em porcentagem relativa ao total de ácidos graxos das amostras) de três grupos diferentes: o grupo NGL, o grupo controle DBT (VEI/VEI) e o grupo DBT que recebeu apenas OP (OP/VEI). A ANOVA de uma via não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para alguns dos ácidos graxos analisados, como por exemplo para os ácidos graxos saturados Mirístico [$F(2, 14) = 0,7265$; $p > 0,05$] e Esteárico [$F(2, 14) = 0,2130$; $p > 0,05$]. Além disso, também não houve diferença para o AGPI n-3 α-linoléico [$F(2, 14) = 2592$; $p > 0,05$].

Para os outros ácidos graxos analisados, a ANOVA de uma via mostrou resultados bem interessantes, como por exemplo, para o ácido graxo saturado Palmítico [$F(2, 14) = 8,054$; $p < 0,05$] o qual, em seguida, o teste de Newman-Keuls mostrou que os grupo de animais DBT tratados com OP apresentaram uma diminuição nos níveis de ácido Palmítico em relação ao grupo NGL ($p < 0,05$). A

ANOVA de uma via também mostrou efeito estatístico para o ácido graxo monoinsaturado Oléico [$F(2, 13) = 28,62$; $p < 0,05$] e, em seguida, o teste *post-hoc* apontou o grupo de animais DBT tratados com OP como diferentes estatisticamente tanto do grupo DBT quanto do grupo NGL, ou seja, a suplementação com OP foi capaz de reduzir os níveis de ácido Oléico desses animais. Para o AGPI n-6 Linoléico, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas [$F(2, 14) = 17,79$; $p < 0,05$] e, o teste de múltiplas comparações mostrou um aumento nos níveis de ácido Linoléico do grupo de animais DBT controle em relação aos animais NGL ($p < 0,05$), enquanto que o grupo DBT tratado com OP mostrou uma redução nos níveis deste ácido graxo em relação ao grupo DBT controle ($p < 0,05$).

A suplementação com OP foi capaz de prevenir o aumento do AGPI n-6 Linoléico causado pelo diabetes experimental, deixando os níveis muito parecido com o dos animais NGL. Para o AGPI n-6 Araquidônico, a ANOVA de uma via também mostrou diferenças estatísticas significativas [$F(2, 14) = 21,17$; $p < 0,05$], e o teste de Newman-Keuls mostrou uma diminuição nos níveis de ácido Araquidônico nos dois grupos DBT (tanto controle quanto tratado com OP) em relação ao grupo NGL ($p < 0,05$). Por fim, os AGPIs n-3 presentes nas cápsulas de OP utilizadas para a suplementação também mostraram resultados significativos na ANOVA de uma via. Para o EPA [$F(2, 14) = 60,24$; $p < 0,05$], no teste de Newman-Keuls o grupo DBT tratado com OP demonstrou um aumento nos níveis de EPA em relação ao grupo NGL e ao grupo DBT controle ($p < 0,05$), confirmando a disponibilidade deste ácido graxo na corrente sanguínea após o período de suplementação. O DHA [$F(2, 14) = 16,73$; $p < 0,05$] mostrou um perfil semelhante ao EPA, em que o teste *post-hoc* também apresentou um aumento nos níveis de DHA no grupo DBT tratado com OP em relação ao grupo DBT controle e ao grupo NGL ($p < 0,05$), confirmando também a disponibilidade de DHA após a suplementação prolongada.

Nestes resultados, observamos que a razão de AGPIs n6:n3 diminui já nos animais DBT controle, e ainda mais quando observamos os animais DBT/OP. Enquanto os animais NGL apresentam uma razão n-6:n-3 de aproximadamente 25:1, uma razão alta de n-6 em relação aos n-3, os animais DBT/OP apresentam uma razão n-6:n-3 de aproximadamente 1:1, mostrando que houve uma diminuição expressiva na razão n-6:n-3.

Para confirmar ainda mais a presença desses AGPIs provenientes da suplementação presentes no plasma dos animais, o índice de insaturação também

aumentou nos animais DBT tratados com OP em relação aos outros dois grupos (NGL e DBT controle).

Tabela 5: Conteúdo de ácidos graxos (%) nas amostras de plasma dos ratos dos grupos normoglicêmicos (NGL), diabéticos (DBT) e diabéticos tratados com óleo de peixe (DBT/OP). ND=não detectado.

Ácido graxo	NGL	DBT	DBT/OP
Láurico (12:0)	ND	ND	ND
Mirístico (14:0)	3,51±4,24	1,75±2,94	5,76±7,48
Palmítico (16:0)	23,38±7,03	17,96±1,25	13,20±2,52*
Esteárico (18:0)	5,92±4,26	6,47±1,11	5,52±1,40
Oléico (18:1)	13,91±2,25	13,20±1,47	7,59±0,90*, **
Linoléico (18:2 n-6)	29,37±5,43	41,93±4,07*	27,36±3,50**
α-linolénico (18:3 n-3)	ND	0,83±1,15	ND
Araquidônico (20:4 n-6)	25,05±4,64	12,95±3,19*	9,89±3,48*
EPA (20:5 n-3)	ND	ND	13,19±3,53* **
DHA (22:6 n-3)	2,24±1,59	4,89±1,59	20,55±8,41* **
Razão n6:n3	24,29	9,58	1,10
Índice de insaturação	182,81	180,69	291,12

Resultados são expressos como média ± desvio padrão; n = 4-6.

*p<0,05 quando comparado ao grupo NGL; **p<0,05 quando comparado ao grupo DBT;

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos em nosso estudo foram que a suplementação prolongada com OP sozinho não foi capaz de prevenir o comportamento do tipo-depressivo e tampouco a redução nos níveis reduzidos de monoaminas no hipocampo dos animais diabéticos. Mais ainda, quando combinado com drogas antidepressivas (FLX ou IMI), o OP induziu apenas uma discreta melhora em comportamentos do tipo-depressivo nos animais com DM1 experimental que foram submetidos ao TNFM, além de pequenas alterações sobre os níveis de monoaminas analisados.

Em relação à incorporação de ácidos graxos no hipocampo e presença destes no plasma dos animais, nossos dados mostraram que os AGPIs n-3 ficaram disponíveis na corrente sanguínea, ou seja, a suplementação funcionou durante o tratamento. Porém, não houve incorporação no hipocampo, ou seja, a suplementação com OP não foi capaz de modificar os níveis de EPA e DHA no hipocampo dos animais com DM1 experimental. Um dado interessante que reforça a ausência de efeito do OP em nosso estudo é que a razão entre AGPIs n-6:n-3 no hipocampo não mudou entre os grupos, o que indica que o perfil lipídico de ácidos graxos desses animais se manteve muito semelhante. Além disso, o índice de insaturação no hipocampo também permaneceu constante nos três grupos avaliados, confirmando a falta de incorporação dos AGPIs n-3 provenientes da suplementação com OP no hipocampo dos animais.

O comportamento tipo-depressivo – frequências altas de imobilidade e baixas de natação e escalada no TNFM – e a associação com os níveis reduzidos de 5-HT e NA no hipocampo de animais diabéticos já foram demonstrados anteriormente em vários estudos, quando comparados a animais não diabéticos (Redivo et al., 2016; da Silva Dias et al., 2016; Kino et al., 2004; ElBatsh, 2015). Sabe-se que vários estudos apontam a suplementação com OP como capaz de aumentar os níveis de 5-HT no hipocampo de animais não diabéticos (Vines et al., 2012; Pudell et al., 2014; Carabelli et al., 2015; Dang et al., 2018). Além disso, uma deficiência de AGPIs n-3 pode afetar a transmissão serotoninérgica (Kodas et al., 2004) e baixos níveis de AGPIs n-3 e 5-HT parecem estar relacionados a um alto risco de suicídio em pacientes depressivos (Daray et al., 2018). Apesar de todas essas evidências, em nosso estudo a suplementação prolongada de oito semanas com OP (3 g/kg)

não causou nenhuma alteração comportamental ou neuroquímica em animais diabéticos, e estes resultados foram altamente intrigantes.

Além disso, esses resultados são contrastantes quando comparados com dados anteriores obtidos por nosso grupo (Redivo et al., 2016). Redivo e colaboradores (2016) observaram efeitos do tipo antidepressivos da suplementação com OP em animais diabéticos (induzido também por STZ) com um protocolo de suplementação semelhante ao utilizado em nosso trabalho, em que tempo de suplementação e dose foram iguais. A diferença que encontramos ao comparar os dois trabalhos foi a concentração dos AGPIs n-3 provenientes das cápsulas de OP. Por conta disto, acreditamos que essa aparente incongruência nos resultados pode estar associada às diferenças nas concentrações de EPA e DHA utilizada em nosso trabalho em comparação ao de Redivo et al. (2016) e de vários outros trabalhos que utilizaram concentrações de AGPIs n-3 diferentes no OP utilizado para a suplementação dos animais. As cápsulas de OP utilizadas no nosso trabalho continham uma concentração de DHA de 50% e EPA de 20%, enquanto as cápsulas usadas por Redivo e colaboradores (2016) continham uma proporção diferente desses AGPIs n-3, ou seja, 20% de DHA e 26% de EPA.

Esta hipótese de que a falta de efeito do tipo antidepressivo encontrada em nosso trabalho se deve às diferentes concentrações de DHA e EPA presentes na cápsula é apoiada por vários estudos que mostraram efeitos benéficos após a suplementação prolongada com OP, ou seja efeitos benéficos do OP sobre o comportamento do tipo depressivo ou ansiogênico e/ou sobre os níveis de 5-HT no hipocampo (Vines et al., 2012; Pudell et al., 2014; Carabelli et al., 2015; Tang et al., 2015; Guo et al., 2018). Nesses estudos, os efeitos foram alcançados apenas com proporções de EPA e DHA mais parecidas com as utilizadas no estudo de Redivo e colaboradores (2016), ou seja, uma proporção de aproximadamente 1:1 de EPA e DHA.

Em relação ao DHA, é bem estabelecido que ele é o AGPI mais abundante no encéfalo e um dos principais componentes estruturais das membranas plasmáticas no sistema nervoso central (Chen et al., 2009). Entretanto, além da importante função estrutural, estudos mostraram que outros AGPIs n-3, entre eles o EPA, são de grande importância para outros mecanismos, como por exemplo a transdução de sinais (Russel e Bürgin-Maunders, 2012). Levando em conta a importância do EPA

como AGPI n-3 importante para funções celulares, fomos em busca de trabalhos que mostrassem outros efeitos importantes deste AGPI n-3.

Uma meta-análise feita em 2009 a partir de análises sobre 28 estudos clínicos mostrou que o EPA é provavelmente o responsável pelo efeito antidepressivo dos AGPIs n-3 (Martins, 2009). Um mecanismo bem importante para explicar o efeito antidepressivo do EPA envolve a hipótese inflamatória de depressão, uma vez que este PUFA tem um perfil anti-inflamatório bem estabelecido (Lonergan et al., 2004; Zhao et al., 2004; Sherratt et al., 2018). Nestas condições, observou-se que o EPA induz efeitos neuroprotetores na região do hipocampo, impedindo o aumento das interleucinas (IL-1 β) e de apoptose neuronal, entre outros efeitos importantes relacionados à inflamação (Lonergan et al., 2004).

Além disso, vários outros estudos envolvendo inflamação mostraram que o EPA inibe o efeito do NF- κ B, um importante regulador da resposta inflamatória, e por sua vez diminui drasticamente a produção e expressão do TNF- α induzido por LPS (Zhao et al., 2004). Corroborando com esses dados, um outro estudo observou que, em 180 dias de suplementação com OP (43 % de EPA e 20% de DHA), houveram alterações na concentração de fosfolipídios da membrana celular no encéfalo com aumento das concentrações de EPA e DHA neste tecido, resultando também em redução da resposta inflamatória e melhorias no sistema serotoninérgico. Os autores atribuem a esses mecanismos a explicação do porquê uma suplementação prolongada com OP foi capaz de prevenir um comportamento tipo-depressivo e de *sickness behavior* induzidos por LPS em camundongos (de Gomes et al., 2018).

Estudos clínicos também apontam que suplementações somente com EPA (Jazayeri et al., 2008; Nemets et al., 2002; Frangou et al., 2006; Mozaffari-Khosravi et al., 2013) parecem ser mais eficazes que outras suplementações ricas em DHA quando se trata do tratamento para depressão maior (Lin et al., 2012; Martins et al., 2009, 2012; Sublette et al., 2011; Mocking et al., 2016). Isso sugeriria que o EPA não está apenas facilitando um aumento de DHA, o que pode acontecer por meio da conversão de EPA em DHA no fígado (Domenichiello et al., 2015; Ganança et al., 2017), mas talvez tenha outras ações relevantes para o efeito antidepressivo.

Uma outra possibilidade é que o EPA pode estar afetando o equilíbrio lipídico de maneiras que a suplementação com DHA não pode, uma vez que a resposta à suplementação estava associada à porcentagem de DHA nos fosfolipídios plasmáticos, mas não a níveis absolutos de fosfolipídios. Isso pode ocorrer porque o

EPA não apenas se transforma em DHA, mas também compete com AGPIs n-6 pró-inflamatórios pelas enzimas transformadoras na via paralela de AGPIs n-6 do ácido Araquidônico ao ácido Docosapentaenóico n-6 (DPA) (Benatti et al., 2004). Assim, pode simultaneamente aumentar a quantidade de DHA enquanto diminui a quantidade de AGPIs n-6 de cadeia longa e, portanto, esses estudos se concentram no EPA como importante na função antidepressiva dos AGPIs n-3.

Em um trabalho de 2004, Naliwaiko e colaboradores demonstraram que uma suplementação muito prolongada com OP em fases diferentes da vida do animal apresentam incorporação de EPA e DHA no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais. As diferenças observadas entre o nosso trabalho e este encontrado na literatura foram que os animais utilizados por Naliwaiko e colaboradores não eram diabéticos, a suplementação foi feita em fases diferentes da vida dos animais (suplementação feita nas mães antes e durante a gestação e lactação, e posteriormente na geração F₁ até 90 dias de idade) e, principalmente, o tempo de suplementação. O trabalho de Naliwaiko et al. (2004) apresenta um tempo de suplementação de dezesseis semanas, o dobro do nosso protocolo de oito semanas. Isto sugere que uma suplementação ainda mais prolongada com OP seja necessária para uma incorporação adequada no hipocampo.

Um outro trabalho interessante (Rathod et al., 2015) mostrou que uma dieta rica em AGPIs n-3 foi capaz de aumentar níveis de DHA no hipocampo de ratos, assim como aumentou o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e melhorou aspectos cognitivos. Esta dieta também foi realizada de forma prolongada, passando por três gerações diferentes (F₀, F₁, F₂). Em um outro estudo de 2012, Hennebelle e colaboradores demonstraram também em um protocolo de dieta enriquecida com AGPIs n-3 por um longo período de exposição aos animais, que o tempo parece ser importante para a incorporação desses ácidos graxos no encéfalo destes animais. O protocolo também foi feito com gerações diferentes recebendo a dieta enriquecida durante muito tempo de vida (2 semanas antes da gestação, durante a gestação e lactação, e até 6 meses de vida da geração F₁), e este trabalho demonstrou um aumento significativo nos níveis de DHA no encéfalo dos animais (Hennebelle et al., 2012). Os resultados desses trabalhos sugerem que o tempo de suplementação parece ser de alta importância para um efeito tipo antidepressivo dos AGPIs n-3, pois estes experimentos foram realizados em protocolos experimentais muito longos.

Em seguida, avaliamos as cápsulas de OP para confirmar os dados fornecidos pelo fabricante, que se mostraram precisos e com uma quantidade grande de AGPIs n-3 disponíveis para a suplementação. A análise seguinte foi a cromatografia líquida para avaliar a quantificação dos ácidos graxos presentes no plasma dos animais. Esta análise foi realizada para confirmação se, após a suplementação, EPA e DHA foram absorvidos e disponibilizados corretamente para posteriores ações no organismo dos animais. O modelo de diabetização com STZ alterou alguns níveis de ácidos graxos, reduzindo concentrações de ácido Palmítico e Araquidônico e aumento níveis de Linolénico. Alguns trabalhos mostram que a indução do DM por STZ é capaz de alterar os perfis lipídicos de ácidos graxos no sistema nervoso central dos animais diabéticos (Müller et al., 1998; Car et al., 2012).

Quando observamos os animais DBT tratados com OP, os resultados nos mostram que a suplementação com OP foi capaz de reduzir níveis do ácido Oléico e dos AGPIs n-6 Linoléico e Araquidônico, e isto condiz com dados da literatura que mostram que, a presença de EPA reduz níveis de n-6, pois este AGPI n-3 compete pelas enzimas dessaturases da cadeia de síntese dos AGPIs n-6 e estes ácidos graxos têm sua formação diminuída (Benatti et al., 2004). Isto se confirma quando observamos os níveis de EPA e DHA no plasma, os AGPIs n-3 que compõe as cápsulas de OP utilizadas para suplementação dos animais.

Nos animais tratados com OP, os níveis de EPA e DHA aumentam significativamente em relação aos animais NGL e DBT controle. Este aumento nos mostra que os AGPIs n-3 provenientes da suplementação foram absorvidos corretamente pelo organismo dos animais e estavam disponíveis na corrente sanguínea para ações posteriores nos tecidos em que fossem necessários. Enquanto nas amostras de hipocampo a razão de AGPIs n-6:n-3 continua constante entre os grupos, no plasma a razão n-6:n-3 diminui nos animais DBT tratados com OP (razão n-6:n-3 é 1:1) quando comparados aos animais NGL (razão n-6:n-3 é 25:1) e DBT controle (razão n-6:n-3 é 9:1). A razão n-6:n-3 considerada ideal para os seres humanos é de 4:1, porém, as civilizações atuais possuem na alimentação industrializada rica em gorduras saturadas e AGPIs n-6, uma razão que pode ir de 20:1 a 40:1, muito mais do que o recomendado. A fonte principal de AGPIs n-6 e n-3 é a alimentação, e por conta do aumento de alimentos industrializados e com grandes quantidades de soja (rica em n-6) na composição, a razão n-6:n-3 vem aumentando com o passar do tempo (Simopoulos, 2009; Calder, 2012).

Os animais NGL que possuem uma alta razão n-6:n-3 têm como única fonte de ácidos graxos a alimentação com ração, enquanto os animais tratados com OP, que possuem uma disponibilização maior de AGPIs n-3, demonstram uma diminuição da razão n-6:n-3, que fica em aproximadamente 1:1, em níveis recomendados e considerados saudáveis.

A razão n-6:n-3 tem implicações médicas importantes, já que os AGPIs n-6 possuem um perfil pró-inflamatório que leva a um aumento de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, enquanto os AGPIs n-3 apresentam características anti-inflamatórias com produção posterior de vários agentes anti-inflamatórios, como as resolvinas (Simopoulos, 2002), e o aumento no consumo de AGPIs n-6 se relaciona com doenças como DM, obesidade, doenças autoimunes, entre outras (Yamazaki et al., 2011). A dieta dos animais utilizadas neste estudo (ração) apresenta uma razão n-6:n-3 correspondente à dieta das civilizações ocidentais, uma razão alta de n-6, que é reduzida nos animais tratados com OP, chegando a 1:1.

O aumento nos níveis de AGPIs n-3 no plasma também gerou um aumento nos níveis de insaturação, confirmando mais uma vez que a suplementação cumpriu seu papel disponibilizando EPA e DHA na corrente sanguínea para os tecidos, mesmo que, no tecido de interesse do nosso estudo, o hipocampo, a incorporação não tenha ocorrido. Dado que no presente estudo o EPA aparece em menor quantidade do que o DHA nas cápsulas de OP, estes resultados podem contribuir para a ausência de efeito sobre o comportamento tipo depressivo e sobre os níveis de serotonina no hipocampo dos animais diabéticos. Além disso, outra explicação viável é o tempo de suplementação. O tempo de suplementação empregado em nosso experimento foi prolongado, mas é provável que o tempo de suplementação precisasse ser ainda maior para que houvesse incorporação adequada no tecido cerebral.

Com o objetivo de estudar um potencial terapêutico da combinação da suplementação prolongada com OP e o tratamento com diferentes antidepressivos, investigamos os efeitos da associação deste composto rico em AGPIs n-3 com FLX ou IMI em ratos diabéticos. No primeiro momento, os experimentos foram realizados com a combinação da suplementação com o OP e o tratamento com o antidepressivo FLX, um ISRS que, conseqüentemente, aumenta os níveis de 5-HT disponível na fenda sináptica. O efeito observado nos animais com DM1

experimental tratados com VEI que receberam tratamento com FLX (10 mg/ kg) foi semelhante a resultados observados anteriormente pelo nosso grupo (da Silva Dias et al., 2016), ou seja, houve uma diminuição no comportamento de imobilidade passiva e um aumento na frequência de comportamento de natação (Figura 6).

Vários estudos têm relacionado o aumento do comportamento de natação no TNFM com o aumento dos níveis de 5-HT (Cryan et al., 2002), o que também corrobora com nosso resultado das análises neuroquímicas no hipocampo desses animais, que mostrou um aumento nos níveis de 5-HT nos grupos que mostraram maiores frequências de natação (Figura 8). Curiosamente, animais diabéticos tratados com OP e que também foram tratados com FLX (10 mg/kg) também apresentaram uma diminuição na frequência de imobilidade e um aumento no comportamento de natação em comparação com animais diabéticos tratados com VEI que receberam FLX (10 mg/kg), sugerindo um efeito antidepressivo um pouco mais pronunciado quando um tratamento combinado (OP/FLX) ocorreu. No entanto, essa diferença não apareceu quando olhamos para os resultados das análises neuroquímicas pois, entre esses mesmos grupos (OP/FLX 10 e VEI/FLX 10), não houve diferença nos níveis de 5-HT no hipocampo.

Todos esses resultados podem sugerir que este efeito antidepressivo um pouco mais pronunciado do grupo tratado com OP e FLX em relação ao grupo VEI/FLX não tenha sido proveniente dos AGPIs n-3 da suplementação. Apesar dessa falta de efeito observada em nosso estudo sobre os níveis de 5-HT no grupo de animais diabéticos tratados com OP, é importante mencionar que não há surpresa que exista de fato uma relação direta entre 5-HT e AGPIs n-3, e como o perfil antidepressivo dos AGPIs n-3 parece ser semelhante ao da FLX (Laino et al., 2010).

Laino e colaboradores (2010), utilizando animais não diabéticos, observaram que uma exposição prolongada a uma dieta rica em AGPIs n-3 produziu efeitos semelhantes aos antidepressivos dose-dependentes no TNFM, exibindo um perfil comportamental semelhante à FLX. O tratamento com FLX (10 mg/kg/dia) produziu efeitos aditivos em combinação com a suplementação de AGPIs n-3 (0,72 mg/kg/dia). Efeitos benéficos da suplementação com AGPIs n-3 (410 mg de EPA e 290 mg de DHA), combinado com doses sub-eficazes de FLX (1 mg/kg/dia) também foram observados, sugerindo que os antidepressivos potenciaram os efeitos do tipo antidepressivo dos AGPIs n-3. E aqui, mais uma vez, a proporção dos AGPIs n-3

utilizados nos experimentos aparenta ser de extrema importância para estes efeitos benéficos observados no comportamento dos animais.

Em relação ao antidepressivo tricíclico IMI, o mecanismo de ação deste medicamento consiste em inibir a recaptação de 5-HT e NA e, conseqüentemente, aumentar as concentrações de 5-HT e NA disponíveis na fenda sináptica (Park et al., 2015). No entanto, é interessante notar que a IMI tem as características mais farmacologicamente desejáveis como inibidor da recaptação de NA (Gillman, 2007).

Como previamente mostrado por trabalhos do nosso grupo (de Moraes et al., 2014), no presente trabalho o tratamento com IMI induziu um efeito do tipo antidepressivo em animais com DM1 experimental, diminuindo a frequência de imobilidade e aumentando a frequência de escalada no TNFM (Figura 7). Este efeito parece estar relacionado com um aumento nos níveis de NA como previamente observado e amplamente discutido na literatura (Cryan et al., 2002) e como mostrado na Figura 8. Como ocorreu após o tratamento com FLX, independente se os animais foram ou não pré-suplementados com OP, o aumento nos níveis de NA foi semelhante, indicando que esse efeito é uma consequência direta do próprio tratamento com IMI.

Curiosamente, quando avaliamos a frequência de natação de animais diabéticos que receberam tratamentos combinados (OP/IMI), ocorre um efeito tipo antidepressivo significativo, sugerindo que a soma dos efeitos discretos induzidos pela suplementação com OP ou tratamento com IMI (sem significância estatística) pode ter contribuído com este efeito no último grupo. No entanto, nenhum efeito de potenciação foi observado nos níveis de 5-HT (Figura 8, painel A). Em camundongos não diabéticos, um efeito do tipo antidepressivo proveniente da combinação de uma dose baixa de IMI (10 mg/kg) com suplementação de AGPIs n-3 foi observado quando os animais foram testados em diferentes modelos animais de depressão, tais como o TNFM, o teste da suspensão pela cauda e o teste de alimentação suprimida pela novidade (Venna et al., 2009). Os autores discutem que mais de cinco semanas de suplementação com uma mistura de AGPIs contendo 70% de ácido α -linolênico induziu efeito do tipo antidepressivo no TNFM, com um aumento nos comportamentos de natação e de escalada. Venna e colaboradores (2009) também observaram que a suplementação com AGPIs estava associada a um aumento no volume do hipocampo, uma super expressão da sinaptofisina e do BDNF e um aumento de neurogênese, indicando a eficácia dos AGPIs

administrados isoladamente ou em combinação com antidepressivos como um potencial tratamento de transtornos depressivos.

Um ponto muito importante que chama a atenção para esses estudos, considerando os resultados contraditórios, é que os efeitos benéficos parecem ser altamente dependentes da diferença no tempo de suplementação, fase da vida do animal e também da composição dos suplementos. Por exemplo, a suplementação de AGPIs utilizada por Venna e colaboradores (2009) continha uma alta concentração de ácido α -linolênico (70% de ácido α -linolênico, mas também 25% de ácido Linolênico e 5% de ácido Oléico). Além disso, os possíveis efeitos do tipo antidepressivos dos AGPIs n-3 foram previamente discutidos em ratos cronicamente alimentados com OP com uma concentração de 27% de AGPIs n-3 (Carlezon et al., 2005) ou dieta rica em n-3 (Huang et al., 2008).

Além da importância da razão entre AGPIs n-3 e n-6 que compõe os produtos ricos em AGPIs e utilizados para a suplementação, nós sugerimos com estes resultados que os diferentes AGPIs n-3 sejam cruciais para produzir os efeitos comportamentais benéficos. Por fim, o tempo de suplementação também parece ser importante para o efeito tipo antidepressivo do OP.

6 CONCLUSÃO

Em relação à hipótese inicial do estudo pode-se concluir que:

- A suplementação prolongada com OP *per se* não preveniu o comportamento do tipo depressivo de animais diabéticos;
- A suplementação prolongada com OP *per se* não preveniu a redução de 5-HT e NA do hipocampo de animais diabéticos;
- A suplementação prolongada com OP *per se* não foi suficiente para incorporar os AGPIs n-3 no hipocampo de animais diabéticos;
- A suplementação com OP, quando em combinação com o tratamento com os antidepressivos, foi capaz de induzir um ligeiro aumento no efeito do tipo antidepressivo avaliado.

REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010 Jan; 33 (Suppl 1): S62–S69. doi: 10.2337/dc10-S062.
- Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2006 Jun;83(6 Suppl):1467S-1476S. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1467S.
- Ashwal E, Hod M. Gestational diabetes mellitus: Where are we now? *Clin Chim Acta*. 2015 Dec 7;451(Pt A):14-20. doi: 10.1016/j.cca.2015.01.021.
- Avila G, Osornio-Garduño DS, Ríos-Pérez EB, Ramos-Mondragón R. Functional and structural impact of pirfenidone on the alterations of cardiac disease and diabetes mellitus. *Cell Calcium*. 2014 Nov;56(5):428-35. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.008.
- Bădescu SV, Tătaru CP, Kobylinska L, Georgescu EL, Zahiu DM, Zăgrean AM, Zăgrean L. Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Life*. 2016 Jul-Sep;9(3):275-279.
- Barnard K, Peveler RC, Holt RI. Antidepressant medication as a risk factor for type 2 diabetes and impaired glucose regulation: systematic review. *Diabetes Care*. 2013 Oct;36(10):3337-45. doi: 10.2337/dc13-0560.
- Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr*. 2004 Aug;23(4):281-302. doi: 10.1080/07315724.2004.10719371.
- Boden MT. Prevalence of mental disorders and related functioning and treatment engagement among people with diabetes. *J Psychosom Res*. 2018 Mar;106:62-69. doi: 10.1016/j.jpsychores.2018.01.001.
- Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015 Sep;39(1 Suppl):18S-32S. doi: 10.1177/0148607115595980.
- Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(4):433. doi: 10.1590/S0100-879X2003000400004.
- Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*. 2012 Mar;142(3):592S-599S. doi: 10.3945/jn.111.155259.
- Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans*. 2017 Oct 15;45(5):1105-1115. doi: 10.1042/BST20160474.

Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*. 2013 Mar;75(3):645-62. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x.

Car H, Zendzian-Piotrowska M, Prokopiuk S, Fiedorowicz A, Sadowska A, Kurek K, Sawicka D. Ceramide profiles in the brain of rats with diabetes induced by streptozotocin. *FEBS J*. 2012 Jun;279(11):1943-52. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08575.x.

Caletti G, Olguins DB, Pedrollo EF, Barros HM, Gomez R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. *Amino Acids*. 2012 Oct;43(4):1525-33. doi: 10.1007/s00726-012-1226-x.

Carabelli B, Delattre AM, Pudell C, Mori MA, Suchecki D, Machado RB, Venancio DP, Piazzetta SR, Hammerschmidt I, Zanata SM, Lima MM, Zanoveli JM, Ferraz AC. The Antidepressant Like Effect of Fish Oil: Possible Role of Ventral Hippocampal 5-HT_{1A} Post-synaptic Receptor. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):206-15. doi: 10.1007/s12035-014-8849-8.

Carlezon WA Jr, Mague SD, Parow AM, Stoll AL, Cohen BM, Renshaw PF. Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biol Psychiatry*. 2005 Feb 15;57(4):343-50. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.11.038.

Carvalho MC, Moreira CM, Zanoveli JM, Brandão ML. Central, but not basolateral, amygdala involvement in the anxiolytic-like effects of midazolam in rats in the elevated plus maze. *J Psychopharmacol*. 2012 Apr;26(4):543-54. doi: 10.1177/0269881110389209.

Chen CT, Liu Z, Ouellet M, Calon F, Bazinet RP. Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009 Feb-Mar;80(2-3):157-63. doi: 10.1016/j.plefa.2009.01.005.

Chhetry BT, Hezghia A, Miller JM, Lee S, Rubin-Falcone H, Cooper TB, Oquendo MA, Mann JJ, Sublette ME. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and white matter changes in major depression. *J Psychiatr Res*. 2016 Apr;75:65-74. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.12.007.

Curi R, Pompeia C, Miyasaka C K; Araújo Filho J P. Entendendo a Gordura. Os Ácidos Graxos. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 May;23(5):238-45. doi: 10.1016/S0165-6147(02)02017-5.

da Silva Dias IC, Carabelli B, Ishii DK, de Moraes H, de Carvalho MC, Rizzo de Souza LE, Zanata SM, Brandão ML, Cunha TM, Ferraz AC, Cunha JM, Zanoveli JM. Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. *Mol Neurobiol*. 2016 Dec;53(10):6997-7009. doi: 10.1007/s12035-015-9617-0.

Dang R, Zhou X, Tang M, Xu P, Gong X, Liu Y, Jiao H, Jiang P. Fish oil supplementation attenuates neuroinflammation and alleviates depressive-like behavior in rats submitted to repeated lipopolysaccharide. *Eur J Nutr*. 2018 Apr;57(3):893-906. doi: 10.1007/s00394-016-1373-z.

Daray FM, Mann JJ, Sublette ME. How lipids may affect risk for suicidal behavior. *J Psychiatr Res*. 2018 Jun 12;104:16-23. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.06.007.

de Gomes MG, Souza LC, Goes AR, Del Fabbro L, Filho CB, Donato F, Prigol M, Luchese C, Roman SS, Puntel RL, Boeira SP, Jesse CR. Fish oil ameliorates sickness behavior induced by lipopolysaccharide in aged mice through the modulation of kynurenine pathway. *J Nutr Biochem*. 2018 May 16;58:37-48. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.05.002.

de Moraes H, Chaves YC, Waltrick APF, Jesus CHA, Genaro K, Crippa JA, da Cunha JM, Zanoveli JM. Sub-chronic treatment with cannabidiol but not with URB597 induced a mild antidepressant-like effect in diabetic rats. *Neurosci Lett*. 2018 Jun 6;682:62-68. doi: 10.1016/j.neulet.2018.06.006.

de Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Baggio CH, Vanvossen AC, Cristina de Carvalho M, da Silva-Santos JE, Bertoglio LJ, Cunha JM, Zanoveli JM. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016 Oct;26(10):1590-600. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.08.007.

de Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, da Cunha JM, Zanoveli JM. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res*. 2014 Jan 1;258:52-64. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.011.

Dei Cas A, Khan SS, Butler J, Mentz RJ, Bonow RO, Avogaro A, Tschoepe D, Doehner W, Greene SJ, Senni M, Gheorghiade M, Fonarow GC. Impact of diabetes on epidemiology, treatment, and outcomes of patients with heart failure. *JACC Heart Fail*. 2015 Feb;3(2):136-45. doi: 10.1016/j.jchf.2014.08.004.

Delattre AM, Carabelli B, Mori MA, Kempe PG, Rizzo de Souza LE, Zanata SM, Machado RB, Suchecki D, Andrade da Costa BLS, Lima MMS, Ferraz AC. Maternal Omega-3 Supplement Improves Dopaminergic System in Pre and Postnatal Inflammation-Induced Neurotoxicity in Parkinson's Disease Model. *Mol Neurobiol*. 2017 Apr;54(3):2090-2106. doi: 10.1007/s12035-016-9803-8.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995 Sep;121(1):66-72. doi: 10.1007/BF02245592.

Domenichiello AF, Kitson AP, Bazinet RP. Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? *Prog Lipid Res*. 2015 Jul;59:54-66. doi: 10.1016/j.plipres.2015.04.002.

DSM-V - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Porto Alegre, Ed. Artes Médicas, 2013.

Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci.* 2015 Apr 21;7:52. doi: 10.3389/fnagi.2015.00052.

Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, Smith RJ, Smith SR. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jun;96(6):1654-63. doi: 10.1210/jc.2011-0585.

ElBatsh MM. Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Aug;93(8):649-56. doi: 10.1139/cjpp-2014-0560.

Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord.* 2013 Dec 23;12(1):60. doi: 10.1186/2251-6581-12-60.

Erenmemisoglu A, Ozdogan UK, Saraymen R, Tutus A. Effect of some antidepressants on glycaemia and insulin levels of normoglycaemic and alloxan-induced hyperglycaemic mice. *J Pharm Pharmacol.* 1999 Jun;51(6):741-3. doi: 10.1211/0022357991772899.

Ferraz AC, Kiss A, Araújo RL, Salles HM, Naliwaiko K, Pamplona J, Matheuss F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008 Mar;78(3):183-8. doi: 10.1016/j.plefa.2008.02.001.

Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry.* 1957. v. 226, p. 497-509.

Frangou S, Lewis M, McCrone P. Efficacy of ethyl-eicosapentaenoic acid in bipolar depression: randomised double-blind placebo-controlled study. *Br J Psychiatry.* 2006 Jan;188:46-50. doi: 10.1192/bjp.188.1.46.

Gagnon J, Lussier MT, MacGibbon B, Daskalopoulou SS, Bartlett G. The Impact of Antidepressant Therapy on Glycemic Control in Canadian Primary Care Patients With Diabetes Mellitus. *Front Nutr.* 2018 Jun 12;5:47. doi: 10.3389/fnut.2018.00047. eCollection 2018.

Gambeta E, de Souza CP, de Moraes H, Zanoveli JM. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. *Metab Brain Dis.* 2016 Jun;31(3):563-71. doi: 10.1007/s11011-015-9770-1.

Ganança L, Galfalvy HC, Oquendo MA, Hezghia A, Cooper TB, Mann JJ, Sublette ME. Lipid correlates of antidepressant response to omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation: A pilot study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2017 Apr;119:38-44. doi: 10.1016/j.plefa.2017.03.004.

Ghaeli P, Shahsavand E, Mesbahi M, Kamkar MZ, Sadeghi M, Dashti-Khavidaki S. Comparing the effects of 8-week treatment with fluoxetine and imipramine on fasting blood glucose of patients with major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 2004 Aug;24(4):386-8.

Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol*. 2007 Jul;151(6):737-48. doi: 10.1038/sj.bjp.0707253.

Gilsanz P, Karter AJ, Beerli MS, Quesenberry CP Jr, Whitmer RA. The Bidirectional Association Between Depression and Severe Hypoglycemic and Hyperglycemic Events in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2018 Mar;41(3):446-452. doi: 10.2337/dc17-1566.

Golden SH, Lazo M, Carnethon M, Bertoni AG, Schreiner PJ, Diez Roux AV, Lee HB, Lyketsos C. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. *JAMA*. 2008 Jun 18;299(23):2751-9. doi: 10.1001/jama.299.23.2751.

Gomez R, Huber J, Tombini G, Barros HM. Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001 Jan;34(1):57-64. doi: 10.1590/S0100-879X2001000100007.

Guo YR, Lee HC, Lo YC, Yu SC, Huang SY. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent d-galactose-induced cognitive deficits in prediabetic rats. *Food Funct*. 2018 Apr 25;9(4):2228-2239. doi: 10.1039/C8FO00074C.

Haider S, Ahmed S, Tabassum S, Memon Z, Ikram M, Haleem DJ. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurol Belg*. 2013 Mar;113(1):35-41. doi: 10.1007/s13760-012-0121-2.

Hendrick AM, Gibson MV, Kulshreshtha A. Diabetic Retinopathy. *Prim Care*. 2015 Sep;42(3):451-64. doi: 10.1016/j.pop.2015.05.005.

Hennebelle M, Balasse L, Latour A, Champeil-Potokar G, Denis S, Lavalie M, Gisquet-Verrier P, Denis I, Vancassel S. Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress. *PLoS One*. 2012;7(7):e42142. doi: 10.1371/journal.pone.0042142.

Hirano S, Miyata S, Onodera K, Kamei J. Effects of histamine H(1) receptor antagonists on depressive-like behavior in diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Feb;83(2):214-20. doi: 10.1016/j.pbb.2006.02.001.

Huang SY, Yang HT, Chiu CC, Pariante CM, Su KP. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J Psychiatr Res*. 2008 Jan;42(1):58-63. Epub 2006 Oct 30. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.09.004.

Huang Y, Wei X, Wu T, Chen R, Guo A. Collaborative care for patients with depression and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*. 2013 Oct 14;13:260. doi: 10.1186/1471-244X-13-260.

International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas*. 8th edition. 2017. <http://www.diabetesatlas.org>

Iqbal A, Novodvorsky P, Heller SR. Recent Updates on Type 1 Diabetes Mellitus Management for Clinicians. *Diabetes Metab J*. 2018 Feb;42(1):3-18. doi: 10.4093/dmj.2018.42.1.3.

Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Keshavarz SA, Hosseini M, Djazayeri A, Amini H, Jalali M, Peet M. Comparison of therapeutic effects of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid and fluoxetine, separately and in combination, in major depressive disorder. *Aust N Z J Psychiatry*. 2008 Mar;42(3):192-8. doi: 10.1080/00048670701827275.

Jia D, Heng LJ, Yang RH, Gao GD. Fish oil improves learning impairments of diabetic rats by blocking PI3K/AKT/nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways. *Neuroscience*. 2014 Jan 31;258:228-37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.016.

Johnson B, Eiser C, Young V, Brierley S, Heller S. Prevalence of depression among young people with Type 1 diabetes: a systematic review. *Diabet Med*. 2013 Feb;30(2):199-208. doi: 10.1111/j.1464-5491.2012.03721.x.

Jump DB, Depner CM, Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J Lipid Res*. 2012 Dec;53(12):2525-45. doi: 10.1194/jlr.R027904.

Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The synthesis of [^{14}C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J*. 1974 Sep;142(3):673-83.

Kino M, Yamato T, Aomine M. Simultaneous measurement of nitric oxide, blood glucose, and monoamines in the hippocampus of diabetic rat: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int*. 2004 Jan;44(2):65-73.

Kodas E, Galineau L, Bodard S, Vancassel S, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J Neurochem*. 2004 May;89(3):695-702. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02401.x.

Lang UE, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(6):761-77. doi: 10.1159/000350094.

Laino CH, Fonseca C, Sterin-Speziale N, Slobodianik N, Reinés A. Potentiation of omega-3 fatty acid antidepressant-like effects with low non-antidepressant doses of fluoxetine and mirtazapine. *Eur J Pharmacol*. 2010 Dec 1;648(1-3):117-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.08.047.

Lau AA, Crawley AC, Hopwood JJ, Hemsley KM. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behav Brain Res.* 2008 Aug 5;191(1):130-6. doi: 10.1016/j.bbr.2008.03.024.

Li M, Song LJ, Qin XY. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J Cell Mol Med.* 2014 May;18(5):749-58. doi: 10.1111/jcmm.12270.

Lin PY, Mischoulon D, Freeman MP, Matsuoka Y, Hibbeln J, Belmaker RH, Su KP. Are omega-3 fatty acids antidepressants or just mood-improving agents? The effect depends upon diagnosis, supplement preparation, and severity of depression. *Mol Psychiatry.* 2012 Dec;17(12):1161-3; author reply 1163-7. doi: 10.1038/mp.2012.111.

Liu JJ, Green P, John Mann J, Rapoport SI, Sublette ME. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Res.* 2015 Feb 9;1597:220-46. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.059.

Lonergan PE, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA. Neuroprotective actions of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced dysfunction in rat hippocampus. *J Neurochem.* 2004 Oct;91(1):20-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02689.x.

Maleckas A, Venclauskas L, Wallenius V, Lönroth H, Fändriks L. Surgery in the treatment of type 2 diabetes *mellitus*. *Scand J Surg.* 2015 Mar;104(1):40-7. doi: 10.1177/1457496914561140.

Majidi S, Driscoll KA, Raymond JK. Anxiety in children and adolescents with type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2015 Aug;15(8):47. doi: 10.1007/s11892-015-0619-0.

Markowitz SM, Gonzalez JS, Wilkinson JL, Safren SA. A review of treating depression in diabetes: emerging findings. *Psychosomatics.* 2011 Jan-Feb;52(1):1-18. doi: 10.1016/j.psych.2010.11.007.

Marsen TA, Pollok M, Oette K, Baldamus CA. Pharmacokinetics of omega-3 fatty acids during ingestion of fish oil preparations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1992 Jul;46(3):191-6. doi: 10.1016/0952-3278(92)90069-U.

Martins JG, Bentsen H, Puri BK. Eicosapentaenoic acid appears to be the key omega-3 fatty acid component associated with efficacy in major depressive disorder: a critique of Bloch and Hannestad and updated meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2012 Dec;17(12):1144-9; discussion 1163-7. doi: 10.1038/mp.2012.25.

Martins JG. EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Nutr.* 2009 Oct;28(5):525-42. doi: 10.1080/07315724.2009.10719785.

Messamore E, Almeida DM, Jandacek RJ, McNamara RK. Polyunsaturated fatty acids and recurrent mood disorders: Phenomenology, mechani

sms, and clinical application. *Prog Lipid Res.* 2017 Apr;66:1-13. doi: 10.1016/j.plipres.2017.01.001.

Michels A, Zhang L, Khadra A, Kushner JA, Redondo MJ, Pietropaolo M. Prediction and prevention of type 1 diabetes: update on success of prediction and struggles at prevention. *Pediatr Diabetes.* 2015 Nov;16(7):465-84. doi: 10.1111/pedi.12299.

Mocking RJ, Harmsen I, Assies J, Koeter MW, Ruhé HG, Schene AH. Meta-analysis and meta-regression of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for major depressive disorder. *Transl Psychiatry.* 2016 Mar 15;6:e756. doi: 10.1038/tp.2016.29.

Mozaffari-Khosravi H, Yassini-Ardakani M, Karamati M, Shariati-Bafghi SE. Eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid in mild-to-moderate depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013 Jul;23(7):636-44. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.08.003.

Müller D, Nitsch RM, Wurtman RJ, Hoyer S. Streptozotocin increases free fatty acids and decreases phospholipids in rat brain. *J Neural Transm (Vienna).* 1998;105(10-12):1271-81. doi: 10.1007/s007020050130.

Naliwaiko K, Araújo RL, da Fonseca RV, Castilho JC, Andreatini R, Bellissimo MI, Oliveira BH, Martins EF, Curi R, Fernandes LC, Ferraz AC. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? *Nutr Neurosci.* 2004 Apr;7(2):91-9. doi: 10.1080/10284150410001704525.

Nemets B, Stahl Z, Belmaker RH. Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psychiatry.* 2002 Mar;159(3):477-9. doi: 10.1176/appi.ajp.159.3.477.

Nishiyama–Naruke A, Souza JA, Carnellós M, Curi R. HPLC Determination of underivatized fatty acids saponified at 37° C analysis of fatty acids in oils and tissues. *Analytical Letters.* 1998 v. 31, n. 14, p. 2565-2576.

Park HJ, Baik HJ, Kim DY, Lee GY, Woo JH, Zuo Z, Chung RK. Doxepin and imipramine but not fluoxetine reduce the activity of the rat glutamate transporter EAAT3 expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Anesthesiol.* 2015 Aug 8;15:116. doi: 10.1186/s12871-015-0098-5.

Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 2003 Apr;44(4):655-67. doi: 10.1194/jlr.R200021-JLR200.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978 Feb 15;47(4):379-91. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8.

Pudell C, Vicente BA, Delattre AM, Carabelli B, Mori MA, Suchecki D, Machado RB, Zanata SM, Visentainer JV, de Oliveira Santos Junior O, Lima MM, Ferraz AC. Fish oil improves anxiety-like, depressive like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomized rats. *Eur J Neurosci.* 2014 Jan;39(2):266-74. doi: 10.1111/ejn.12406.

Quinn PJ. Sphingolipid symmetry governs membrane lipid raft structure. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jul;1838(7):1922-30. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.02.021.

Rathod RS, Khaire AA, Kale AA, Joshi SR. Beneficial effects of omega-3 fatty acids and vitamin B12 supplementation on brain docosahexaenoic acid, brain derived neurotrophic factor, and cognitive performance in the second-generation Wistar rats. *Biofactors*. 2015 Jul-Aug;41(4):261-72. doi: 10.1002/biof.1222.

Redivo DD, Schreiber AK, Adami ER, Ribeiro DE, Joca SR, Zanoveli JM, Cunha JM. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. *Behav Brain Res*. 2016 Feb 1;298(Pt B):57-64. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.058.

Renn BN, Feliciano L, Segal DL. The bidirectional relationship of depression and diabetes: a systematic review. *Clin Psychol Rev*. 2011 Dec;31(8):1239-46. doi: 10.1016/j.cpr.2011.08.001.

Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J Affect Disord*. 2012 Oct;142 Suppl:S8-21. doi: 10.1016/S0165-0327(12)70004-6.

Russell FD, Bürgin-Maunders CS. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Mar Drugs*. 2012 Nov 13;10(11):2535-59. doi: 10.3390/md10112535.

Schreiber AK, Nones CFM, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015 Apr 15; 6(3): 432–444. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.432.

Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):5922-43. doi: 10.1021/cr100396c.

Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 2013 Sep;6(3):126-35. doi: 10.2478/intox-2013-0020.

Sherratt SCR, Mason RP. Eicosapentaenoic acid inhibits oxidation of high density lipoprotein particles in a manner distinct from docosahexaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Feb 5;496(2):335-338. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.062.

Siba IP, Bortolanza M, Frazão Vital MAB, Andreatini R, da Cunha JM, Del Bel EA, Zanoveli JM. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. *Behav Brain Res*. 2017 May 30;326:173-186. doi: 10.1016/j.bbr.2017.03.008.

Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016 Mar 2;8(3):128. doi: 10.3390/nu8030128.

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet.* 2009;100:1-21. doi: 10.1159/000235706.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002 Oct;56(8):365-79. doi: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6.

Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, Groop PH, Handelsman Y, Insel RA, Mathieu C, McElvaine AT, Palmer JP, Pugliese A, Schatz DA, Sosenko JM, Wilding JP, Ratner RE. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes.* 2017 Feb;66(2):241-255. doi: 10.2337/db16-0806.

Sublette ME, Ellis SP, Geant AL, Mann JJ. Meta-analysis of the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in clinical trials in depression. *J Clin Psychiatry.* 2011 Dec;72(12):1577-84. doi: 10.4088/JCP.10m06634.

Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012 May;237(5):481-90. doi: 10.1258/ebm.2012.011372.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.

Tang M, Jiang P, Li H, Liu Y, Cai H, Dang R, Zhu W, Cao L. Fish oil supplementation alleviates depressant-like behaviors and modulates lipid profiles in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC Complement Altern Med.* 2015 Jul 17;15:239. doi: 10.1186/s12906-015-0778-1.

Temelkova-Kurktschiev T, Stefanov T. Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012 Jan;120(1):1-6. doi: 10.1055/s-0031-1285832.

Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Jul 30;1:15018. doi: 10.1038/nrdp.2015.18.

Venna VR, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology.* 2009 Feb;34(2):199-211. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.08.025.

Vines A, Delattre AM, Lima MM, Rodrigues LS, Suchecki D, Machado RB, Tufik S, Pereira SI, Zanata SM, Ferraz AC. The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology.* 2012 Jan;62(1):184-91. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.06.017.

Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015 Apr 2;8:181-8. doi: 10.2147/DMSO.S82272.

Wu YQ, Dang RL, Tang MM, Cai HL, Li HD, Liao DH, He X, Cao LJ, Xue Y, Jiang P. Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Alleviates Doxorubicin Induced Depressive-Like Behaviors and Neurotoxicity in Rats: Involvement of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Nutrients*. 2016 Apr 23;8(4):243. doi: 10.3390/nu8040243.

Yamazaki RK, Brito GA, Coelho I, Pequitto DC, Yamaguchi AA, Borghetti G, Schiessel DL, Kryczyk M, Machado J, Rocha RE, Aikawa J, Iagher F, Naliwaiko K, Tanhoffer RA, Nunes EA, Fernandes LC. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. *Lipids Health Dis*. 2011 Apr 28;10:66. doi: 10.1186/1476-511X-10-66.

Zanoveli JM, Morais Hd, Dias IC, Schreiber AK, Souza CP, Cunha JM. Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment. *Curr Diabetes Rev*. 2016;12(3):165-78. doi: 10.2174/1573399811666150515125349.

Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. *J Am Coll Nutr*. 2004 Feb;23(1):71-8. doi: 10.1080/07315724.2004.10719345.

Zhou X, Zhang W, Liu X, Zhang W, Li Y. Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia. *Arch Oral Biol*. 2015 Apr;60(4):667- 74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.11.008.